Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis und einige Experimente zur Wirkungsweise der Sideramine

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

SARA ALEXANIAN

aus Teheran

1971

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis und einige Experimente zur Wirkungsweise der Sideramine

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

SARA ALEXANIAN

aus Teheran

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Febr. 1971

D e k a n : Professor Dr. D. Varjú
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter: Dozent Dr. H. Diekmann

Druck: aku- Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie, der Universität Tübingen ausgeführt.

Für die großzügige Unterstützung, die ausgezeichnete Betreuung und Förderung der Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. H. Zähner und Herrn Dozent Dr. H. Diekmann herzlich danken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0086

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Definition	1
1.2. Struktur und Eigenschaften	1
1.3. Funktion der Sideramine	9
1.4. Spezifität der Sideraminfunktion	11
1.5. Problemstellung	13
2. Experimenteller Teil	15
2.1. Versuchsorganismen	15
2.2. Chemikalien	15
2.3. Nährmedien	16
2.4. Methoden	17
2.4.1. Inkubationsbedingungen	17
2.4.2. Herstellung der Testlösungen	18
2.4.3.-8. Biologische Testmethoden	18
3. Ergebnisse	25
3.1. Antagonismus auf Agarplatten	25
3.2. Antagonismus im flüssigen Medium	30
3.3. Sideramine als Wuchsstoffe für Microbacterium lacticum	33
3.4. Zusammenhang zwischen Impfdichte und Sideraminabhängigkeit bei Microbacterium lacticum	36
3.5. Sideramin-Sideromycin-Antagonismus nach Vorinkubation mit dem Antibiotikum	38
3.6. Änderung der Katalaseaktivität durch Sideramine	40
4. Diskussion	43
5. Zusammenfassung	53
6. Literaturverzeichnis	55

1. Einleitung

1.1. Definition

Es ist eine große Zahl von natürlich vorkommenden organischen Verbindungen bekannt, die mit Eisen (III)-Ionen Komplexe bilden und bei Mikroorganismen biologische Aktivität zeigen. Sie sind durch folgende Merkmale charakterisiert:

Wasserlöslichkeit,
rotbraune Farbe des Eisenkomplexes,
eine breite Absorbtionsbande mit
einem Maximum bei 420 bis 440 nm.

Alle diese Verbindungen enthalten Hydroxamsäuregruppierungen, die die Bindung mit Eisen eingehen. Sie wurden von Bickel et al. (1960) unter der Bezeichnung "Siderochrome" zusammengefaßt.

Man unterteilt sie in Sideromycine mit antibiotischer und Sideramine mit wachstumsfördernder Wirkung. Die Sideromycin-Wirkung kann spezifisch von Sideraminen antagonisiert werden. Eine dritte Gruppe bilden die biologisch inaktiven Siderochrome.

1.2. Struktur und Eigenschaften

Sideromycine wurden bisher nur bei Actinomyceten gefunden. Dem Wirkungsspektrum und dem papierchromatographischen Verhalten nach unterschieden Bickel et al. (1960) drei Gruppen:

Zur Gruppe 1 gehören die zwei identischen Antibiotika Albomycin (Gause, 1955; Gause und Brazhnikowa, 1957) und Grisein (Reynolds et al., 1947; Reynolds und Waksman, 1948),

zur Gruppe 2 die Antibiotika A22765 (Gäumann et al., 1961), Succinomycin (Haskell et al., 1963) und Danomycin (Tsukiura et al., 1964),

zur Gruppe 3 die Ferrimycine (Bickel et al., 1960).

Während Albomycin und Grisein ein relativ breites Wirkungsspektrum besitzen, sind Ferrimycine nur gegen grampositive Bakterien wirksam.

Gegenüber allen Sideromycinen haben jedoch die Bakterien eine verhältnismäßig hohe Resistenzrate, wobei stets Kreuzresistenz beobachtet wird.

Im Gegensatz zu den Sideromycinen ist die Sideraminproduktion bei zahlreichen Mikroorganismen nachgewiesen. Zunächst wurden sie wegen ihrer Farbe entdeckt. 1952 isolierte Neilands aus dem Basidiomyceten Ustilago sphaerogena das Ferrichrom. Im synthetischen Medium bildet der Stamm unter Zink-Zusatz große Mengen von Hämoproteinen (Weisel und Allen, 1951). Neilands konnte feststellen, daß diese Hämoproteine zum großen Teil aus Cytochrom c bestehen. Nach der Entfernung des gesamten Cytochrom c blieb eine rotbraune Substanz in der Lösung zurück. Sie wurde auskristallisiert und als "Ferrichrom" bezeichnet.

Durch die gleichzeitig erfolgte Entdeckung einiger Mikroorganismen, die für Hämin oder Sideramine auxotroph sind, (als erster Pilobolus kleinii aus Mucorales, Page, 1952), wurde der biologische Nachweis der Sideramine ermöglicht. Inzwischen sind zahlreiche Sideramine bekannt, bei denen analog den Sideromycinen nach der chemischen Struktur einige Grundtypen zu unterscheiden sind.

Bemerkenswert ist, daß ein gewisser Zusammenhang zwischen der Herkunft (den produzierenden Stämmen) und dem chemischen Aufbau besteht.

1.2.1. Ferrichrom-Typ

Diesem entspricht bei den Sideromycinen der Albomycin-Typ. Sideramine dieser Struktur sind bis jetzt hauptsächlich aus Pilzen, besonders Aspergillaceen isoliert worden. Die Strukturuntersuchungen (Emery und Neilands, 1959, 1960, 1961;

Rogers et al., 1963; Garibaldi und Neilands, 1955; Zähner et al., 1963; Keller-Schierlein, 1963; Keller-Schierlein und Deér, 1963) haben gezeigt, daß das Molekül, ein cyclisches Hexapeptid, aus drei Mol δ-N-Hydroxyornithin und drei Aminosäuren Glycin oder Glycin und Serin im Verhältnis von 2 : 1 oder 1 : 2 besteht. Die Hydroxamatkonstitution entsteht durch Acylierung am δ-N-Atom des δ-N-Hydroxyornithins mit folgenden Carbonsäuren:

Essigsäure (bei Ferrichrom, Ferrichrosin, Ferrichrysin),
cis-5-Hydroxy-3-methylpentensäure (bei Ferrirhodin),
trans-5-Hydroxy-3-methylpentensäure (bei Ferrirubin),
trans-ß-Methylglutaconsäure (bei Ferrichrom).

Es sind jeweils drei gleiche Acylreste eingebaut.

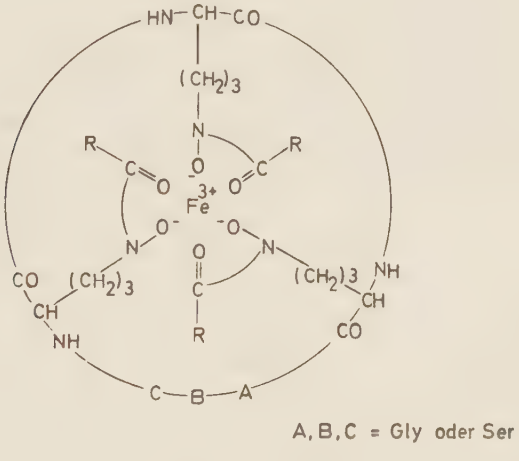

Abb. 1: Grundstruktur des Ferrichromtyps

Neben dem Ferrichrom-Typ gibt es bei Pilzen noch Coprogene und Fusigene.

Coprogen, 1952 von Hesseltine beschrieben, besteht aus drei Molekülen trans-Fusarinin: ein δ-N-Hydroxyornithin, das am δ-N-Atom mit trans-5-Hydroxy-3-methyl-2-penten-säure acyliert ist (Keller-Schierlein et al., 1964; Diekmann, 1969). Zwei der Fusarinin-Moleküle sind peptidartig zu einem Diketopiperazinring gebunden (Dimerumsäure, Diekmann, 1970). Das dritte Molekül geht mit einer der Hydroxylgruppen der Dimerumsäure eine Esterbindung ein (Keller-Schierlein und Diekmann, 1970).

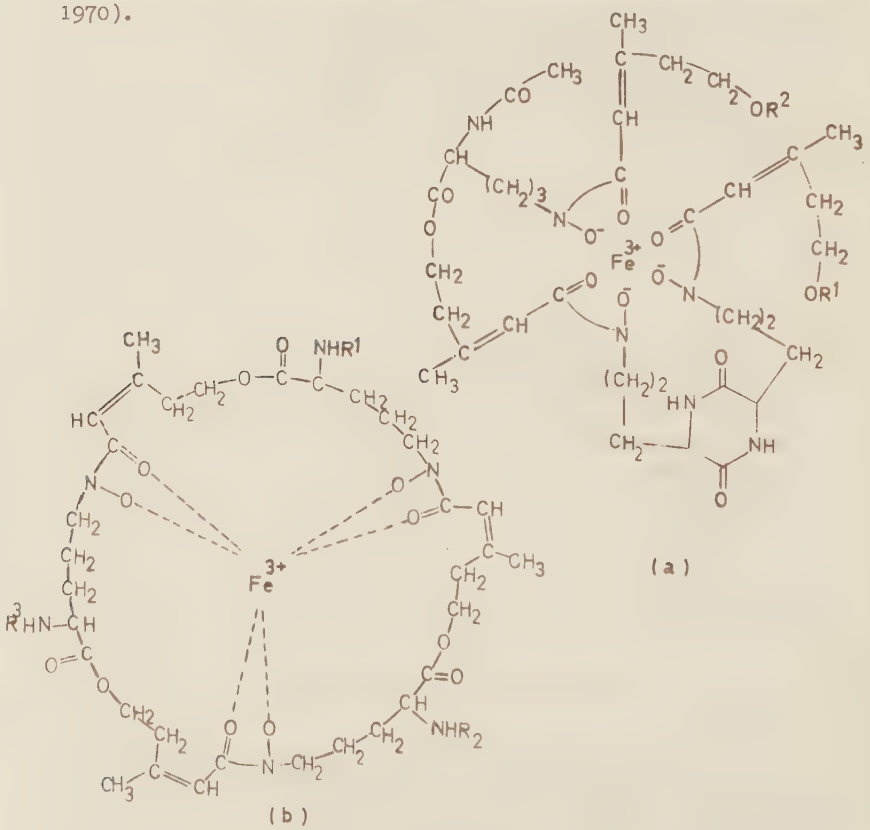

Abb. 2: a) Struktur von Coprogen b) Struktur von Fusigen

Fusigen, isoliert aus Fusarium cubense (Diekmann, 1967), ist der Prototyp einer Verbindungsklasse, die neben den Ferrichromen und Coprogenen bei Fusarium- und Penicillium-Arten vorkommen.

Es ist aus drei Molekülen δ-N-Hydroxyornithin und drei Molekülen cis-5-Hydroxy-3-methylpentensäure, aber mit völlig anderer Bindungsart, zusammengesetzt. Die Carboxylgruppen der Ornithinreste sind nicht peptidartig verknüpft, sondern mit Hydroxylgruppen der Pentensäure verestert. Auf diese Weise entsteht ein macrocyclisches Molekül (Diekmann und Zähner, 1967; Sayer und Emery, 1968).

1.2.2. Ferrioxamin-Typ

Substanzen dieser Gruppe kommen meist bei Actinomyceten vor. Die Produzenten gehören vorwiegend den Gattungen Streptomyces, Micromonospora, Nocardia und Streptosporangium an. In der Struktur der Ferrioxamine sind drei Moleküle 1-Amino-5-hydroxylaminopentan oder 1-Amino-4-hydroxylaminobutan beteiligt. Durch zwei Mol Bernsteinsäure werden diese Bausteine peptidartig zu einer Kette verknüpft.

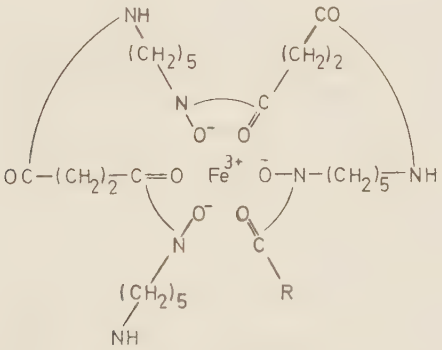

Abb. 3: Grundstruktur des Ferrioxamintyps

Bei den Ferrioxaminen B, D_1 und A_1 ist die am Ende der Kette freistehende Hydroxylaminogruppe acetyliert, während sich bei G, E und D_2 an dieser Stelle ein Bernsteinsäureacylrest befindet. Die zweite Carboxylgruppe dieses Dicarbonsäurerestes bleibt bei Ferrioxamin G frei, wodurch der amphotere Charakter der Verbindung hervorgerufen wird. Bei E und D_2 geht sie mit der freien NH_2-Gruppe der Kette eine Peptidbindung ein, und es entsteht eine cyclische Struktur.

Ferrioxamine werden aber auch bei echten Bakterien gebildet. Aus Chromobacterium violaceum bergonzini und Arthrobacter symplex (Jensen) Lochhead gewann Müller (1968) Sideramine, die sie als Ferrioxamine E und B identifizieren konnte. Bei Brevibacterium flavum hat T. L. Go (1969) die Bildung eines unbekannten Sideramins nachgewiesen.

Ferrimycine können als Derivate der Ferrioxamine bezeichnet werden. Beispielsweise besitzt Ferrimycin A_1 die Konstitution von Ferrioxamin B mit einem substituierten Benzoylrest an der freien Aminogruppe (Bickel et al., 1960).

1.2.3. Mycobactin

Aus Mycobacterium phlei isolierten Francis et al. (1953) einen rotbraunen Fe-Komplex, der für das Wachstum von Mycobacterium johnei essentiell ist und die Sideramine bei den auxotrophen Stämmen ersetzen kann. Der Stoff wurde "Mycobactin" genannt. Inzwischen sind mehrere Mycobactine bekannt

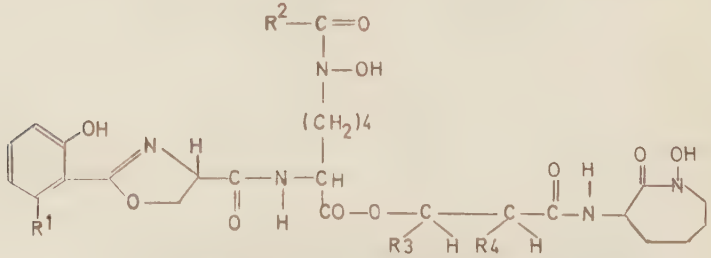

Abb. 4: Grundstruktur der Mycobactine

(Snow und White, 1969). Sie besitzen die gleiche Grundstruktur und unterscheiden sich an den Seitenketten, den asymmetrischen Zentren und den Substituenten des im Molekül enthaltenen Phenolringes. Eine Übersicht über das Vorkommen, die Struktur und Wirkungsweise der Mycobactine gibt Snow (1970).

1.2.4. Hydroxamsäuren aus Pseudomonadales und Eubacteriales

a) Terregens-Faktor: Diese Verbindung wurde 1952 von Lochhead et al. aus Arthrobacter pascens isoliert. Sie hat Wuchsstoffeigenschaften und antagonistische Wirkung gegen Sideromycine. Nach Untersuchungen von Müller (1968) sind im Molekül zwei Hydroxamatfunktionen vorhanden, die vermutlich durch Acylierung von zwei Mol 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan entstehen. Als Carbonsäurebausteine werden Itaconsäure und Citronensäure angenommen. Der Terregens-Faktor bildet sowohl mit Ferri- als auch mit Ferro-Ionen stabile Komplexe.

b) Aerobactin: Sehr ähnlich dem Terregens-Faktor ist die aus Aerobacter aerogenes isolierte Substanz Aerobactin. Sie enthält zwei Mol δ-N-Hydroxy-N-acetylornithin, die mit den zwei Carboxylgruppen eines Citronensäuremoleküls peptidartig gebunden sind (Gibson und Magrath, 1969).

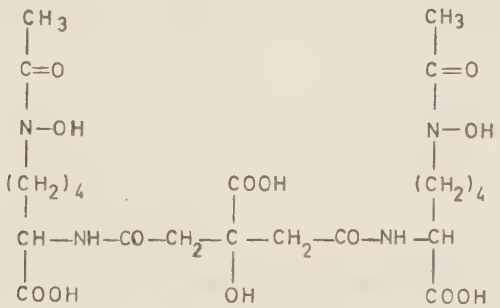

Abb. 5 : Struktur von Aerobactin

c) Ferribactin: Nach Maurer et al. (1968) scheidet Pseudomonas fluorescens bei Anzucht unter Eisenmangel ein Polypeptid in die Nährlösung aus, das mit Ferri-Ionen einen stabilen Komplex bildet. Dieser Eisenkomplex, Ferribactin genannt, stellt ein Dihydroxamat dar und enthält mindestens die folgenden Bausteine: Je 1 Mol Glycin, L-Serin, D-Serin, L-Glutaminsäure, δ-N-Hydroxy-L-ornithin, δ-N-Hydroxy-D-ornithin, D-Tyrosin, 3 Mol L-Lysin und 2 Mol Essigsäure.

d) Schizokinen: Bacillus megaterium de Bary bildet nach Untersuchungen von Lankford et al. (1957, 1958, 1966) unter Eisenmangel einen Faktor, der das von der Einsaatdichte abhängige Wachstum einiger Bacillus-Arten wie B. globigii, B. megaterium und B. subtilis var. niger starten kann. Außerdem hebt er die Wirkung von Ferrimycin bei diesen Organismen auf und stimuliert bei dem sideraminauxotrophen Stamm Arthrobacter JG9 das Wachstum (1/100 der Wirkung von Ferrioxamin B nach Byers et al., 1967). Der Stoff, Schizokinen genannt, wird aufgrund seines spektralen Verhaltens (pH-Abhängigkeit des Absorbtionsmaximums im sichtbaren Bereich) den Monohydroxamsäuren zugeordnet (Byers et al., 1967).

e) An dieser Stelle sind einige neu entdeckte Substanzen zu erwähnen, die ebenfalls unter Eisenmangel von Pseudomonadales und Eubacteriales in die Kulturlösung ausgeschieden werden. Es handelt sich um folgende Verbindungen:

2,3-Dihydroxybenzoyl-glycin, Itosäure genannt, aus Bacillus subtilis (Peters und Warren, 1968),

2,3-Dihydroxybenzoylserin, aus Escherichia coli def. Mut. ton. B (Ching-Chung-Wang und Austin-Newton, 1969),

2-N,6-N-di(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-Lysin aus Azotobacter vinelandii (Corbin und Bulen, 1969),

Enterobactin aus Salmonella typhimurium mit der unten gezeichneten Formel (Pollack und Neilands, 1970; O'Brien und Gibson, 1970).

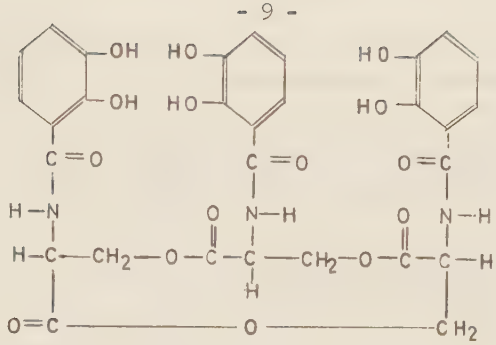

Abb. 6: Struktur von Enterobactin

Alle genannten Verbindungen werden von freier 2,3-Dihydroxybenzoesäure begleitet.

Aus Pilzen und Hefen wurden Hydroxamatgruppen-enthaltende Verbindungen isoliert, deren Strukturen nicht den Grundtypen der Siderochrome folgen.(s. Neilands, 1966). Hier sind zu erwähnen:

a) Rhodotorulasäure aus Rhodotorula, ein Diketopiperazin aus zwei Molekülen δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxyornithin (Atkin et al., 1970). Sie hat strukturelle Ähnlichkeit mit Dimerumsäure und wirkt als Wuchsstoff bei sideraminauxotrophen Stämmen.

b) Aspergillsäure, ein Antibiotikum, das gleichzeitig Wuchsstoffeigenschaften für Microbacterium lacticum hat (Demain und Hendlin, 1959).

1.3. Funktion der Sideramine

Die selektive Komplexbildung der Hydroxamat-Funktion mit Ferri-Ionen und die Produktion der Sideramine unter Eisenmangelbedingungen führten zur Annahme, daß die Siderochrome am Eisen-Stoffwechsel beteiligt sind.
Nach Neilands (1957) ist die Menge des in der lebenden Zelle vorhandenen Eisens größer als die, die den Hämoproteinen der

Zelle zukommt. Ein Teil dieses Eisen-Überschusses soll nicht-häminartigen Komponenten zugeschrieben werden.

Neilands wie auch Demain und Hendlin (1959) nehmen an, daß Sideramine als Coenzyme für den Eisen-Transport im mikrobiellen Stoffwechsel dienen.

Porra und Jones (1963a, 1963b) sowie Lochhead et al. (1963) vermuten eine Beteiligung der Sideramine am Einbau von Eisen in Protoporphyrin.

Nach Lascelles (1956) können zellfreie Extrakte von Rhodopseudomonas spheroides Hämin synthetisieren, wenn Protoporphyrin IX, ein oxidierbares Substrat und Eisen in Form des Ferrichroms vorliegen.

Um den Wirkungsort der Sideramine genauer zu ermitteln, hat man versucht, deren Wirkung im Zusammenhang mit Sideromycinen zu betrachten:

Gause beschrieb 1955, daß Albomycin nur unter aeroben Bedingungen hemmen kann, d. h. nur dann, wenn die Energiegewinnung über das Cytochromsystem verläuft.
Arthrobacter JG9 ist für die Katalasebildung auf exogene Zufuhr von Hämin oder Ferrichrom angewiesen. Ferrimycin A hemmt trotz Ferrichromzusatz die Synthese der Katalase. Wird statt Ferrichrom Hämin zugesetzt, so bleibt das Antibiotikum ohne Einfluß (Burnham, 1962).

Auf diesen und ähnlichen Ergebnissen basiert die Hypothese von Zähner (1962): Sideramine sind spezifische eisenliefernde Faktoren für den Einbau des Eisens in den Protoporphyrin-Ring. Sideromycine hemmen die Übertragung des Eisens auf die Protoporphyrine.

Eine zweite Hypothese vertreten Knüsel und Nüesch (1966), die den Sideraminen und Sideromycinen zwei voneinander getrennte Wirkungsorte und -mechanismen zuteilen. Nach diesen Autoren greifen die Sideromycine im Kohlenhydrat-Stoffwechsel

ein, während Sideramine eine unspezifische Funktion, beim Eisen-Transport in der Zelle, ausüben. Sie argumentieren mit folgenden Beobachtungen:

Albomycin und Ferrimycin hemmen auch in anaeroben Kulturen das Wachstum von Staphylococcus aureus und Escherichia coli (Nüesch und Knüsel, 1966).

Bei der Mutante Staphylococcus aureus JT52 zeigt KCN keinen Einfluß, wenn der Stamm ohne Häminzufuhr gezüchtet wird. Es bedeutet, daß unter diesen Bedingungen das Cytochromsystem ausfällt. Ferrimycin konnte hier doch eine Hemmwirkung erzielen (Nüesch und Knüsel, 1966).

Micrococcus glutamicus wird von Antibiotikum A22765 nur dann gehemmt, wenn Glucose als Kohlenstoff-Quelle dient. Bei Angebot von Acetat als einziger C-Quelle hat das Antibiotikum keine Wirkung.

Bei Brevibacterium flavum, auf Glucose gezüchtet, hemmt das Antibiotikum A22765 die Glutaminsäureausscheidung. Diese Wirkung wird von Ferrioxamin B nicht aufgehoben (Nüesch et al., 1967).

Der Einbau von Aminosäure Leucin wird bei Staph. aureus und B. subtilis durch A22765 in der lag-Phase gehemmt. Auch der Uracil-Einbau in Nucleinsäure wird negativ beeinflußt. Ferrioxamin B antagonisiert die Vorgänge nicht (Knüsel et al., 1967).

Im zellfreien System von Staph. aureus SG 511 hemmen die Sideromycine Danomycin und A22765 den Poly-U-gesteuerten Einbau von Phenylalanin. Dieser wird von Albomycin nicht beeinflußt und von Ferrimycin A sogar beschleunigt. Diese Beobachtung könnte als Hinweis dafür aufgefaßt werden, daß Sideromycine verschiedene Wirkungsmechanismen haben (Knüsel et al., 1969).

Für den Antagonismus Sideramin-Sideromycin wird von Zimmermann und Knüsel (1969) die unterschiedliche Permeabilität

verantwortlich gemacht. Bei einem Versuch mit Staph. aureus SG511 stellten sie fest, daß das Antibiotikum A22765 nach dem Zusatz gegen ein Konzentrationsgefälle aus dem Medium aufgenommen wird. Die gegen das Antibiotikum resistenten Zellen zeigen dagegen eine äußerst geringe Permeabilität. Wird Ferrioxamin B zuerst zugegeben, so dringt es in geringen Mengen in den Zellen ein und verhindert die Permeation des Antibiotikums.

1.4. Spezifität der Sideraminfunktion

Die Spezifität der Sideraminwirkung wurde durch die Beobachtung, daß mehrere synthetische Metall-Chelatbildner das Wachstum der sideraminauxotrophen Stämme stimulieren und in manchen Fällen Antagonismus gegen Sideromycine zeigen, in Frage gestellt.

Ramsey und Lankford (1955) berichten über Wuchsstoffeigenschaften der Hitzeumwandlungsprodukte von autoklavierten Glucose-Phosphat-Lösungen. Sie beeinflussen den Wachstumsbeginn, aber nicht die Wachstumshöhe verschiedener Mikroorganismen. Wolin und Naylor (1955) stellten fest, daß Micrococcus lysodeicticus in einfachem synthetischen Medium nur dann wächst, wenn alle Komponenten zusammen autoklaviert werden. In einer Nährlösung mit getrennt sterilisierten Ingredienten können Spuren von Ferrichrom oder Citronensäure, 8-Hydroxychinolin, autoklavierte Lösung von Glucose+ Na-glutamat, das Wachstum ermöglichen.

Saergeant et al. (1957) und Lankford et al. (1957) beschreiben die fördernde Wirkung verschiedener Metall-Chelatbildner auf das Wachstum von Bacillus globigii.

Demain und Hendlin (1959) untersuchten das Wachstum von Microbacterium lacticum ATCC 8181. Neben Sideraminen und Aspergillsäure waren viele organische Chelatbildner wirksam. Cytochrom c, Hämin und Protoporphyrine zeigten die erwarteten schwachen Aktivitäten. Nach diesen Autoren ist Ferrichrom die aktivste Verbindung, deren Einfluß auf die Verkürzung der

lag-Phase beruht. Die absolute Wachstumshöhe bleibt jedoch dabei unverändert. Bei den Untersuchungen von Zähner et al. (1960) erwiesen sich Ferrioxamine für den Stamm als aktivste Verbindungen, die hauptsächlich eine Erhöhung des Wachstums erzielen.

Antoine et al. (1964) und Morrison et al. (1965) befaßten sich mit der Wirkung von Chelatbildnern auf das Wachstum von Arthrobacter terregens. Auch bei diesem Organismus erwiesen sich Verbindungen wie 8-Hydroxychinolin, Salicylaldehyd, Acetylaceton und Benzoylaceton aktiv. Sie folgerten daraus, daß zwei Merkmale für die Wirksamkeit erforderlich sind: die Fähigkeit, mit Ferri-Ionen Komplexe zu bilden, und der lipophyle Charakter des Metallkomplexes.

1.5. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die eben beschriebene und noch nicht geklärte Frage nach der Spezifität der Sideraminwirkung beantwortet werden.

Alle bisher erwähnten Verbindungen haben als einziges gemeinsames Merkmal die Eigenschaft, mit Eisen-Ionen Komplexe zu bilden, denn der lipophile Charakter des Eisenkomplexes, der von Antoine et al. (1964) und Morrison et al. (1965) für die Aktivität für notwendig gehalten wird, ist bei Siderochromen und anderen Hydroxamsäuren nicht vorhanden.

Zunächst war zu untersuchen, in welchem Maß und auf welche Weise diese Verbindungen einander in ihren biologischen Funktionen vertreten können. Einen Hinweis dafür kann die Höhe der wirksamen Konzentration geben. Daher erschien es notwendig, wenigstens einen Teil dieser genannten Verbindungen unter einheitlichen Bedingungen mit biologischen Methoden, nämlich Antagonismustest und Wuchsstofftest, zu prüfen. Dabei sollte sich herausstellen, welche dieser Methoden für den Nachweis geeigneter ist.

Weiterhin sollten Experimente zur Beantwortung der Frage ge-

macht werden, wie die Sideramine bei auxotrophen Zellen fungieren. Wenn man annimmt, daß sie am Aufbau von Porphyrinen beteiligt sind, sollte das Ausbleiben des Wachstums bei sideraminauxotrophen Stämmen unter Sideraminmangel auf eine Störung des Cytochromsystems beruhen. Sideraminzufuhr erzielt in diesem Fall zunächst eine starke Förderung der Synthese der Porphyrinenzyme. Katalase, ein leicht zugängliches und meßbares Enzym dieser Gruppe, eignet sich zum Studium der Hypothese.

2. Experimenteller Teil

2.1. Versuchsorganismen

Die drei zum Versuch verwendeten Bakterienstämme sind grampositiv aus der Ordnung Eubacteriales:

Microbacterium lacticum Orla Jensen, Gattung Corynebacteriaceae, ATCC 8181, sideraminauxotroph;

Staphylococcus aureus, Gattung Micrococcaceae, Stamm 2070 der ETH, Zürich;

Bacillus subtilis Kohn, Bacillaceae, Stamm 2016 der ETH, Zürich.

2.2. Chemikalien

Zum großen Teil waren die verwendeten Chemikalien analysenreine Substanzen der Firma Merck, Darmstadt. Von anderen Lieferanten wurden bezogen:

Bactoagar, Hefeextrakt und Casaminoacids von Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA,

D-Glucose von Bonz und Sohn GmbH, Böblingen,

RNS aus Hefe von Sigma, St. Louis, Missouri, USA,
die Vitamine Riboflavin, p-Aminobenzoesäure, Ca-pantothenat, Nicotinamid, Folsäure, Vitamin B_{12} und Inosit von Calbiochem, Los Angeles, California, USA,

Xanthin, Pyridoxal und Pyridoxamin von Fluka AG, Buchs, Schweiz,

K_2HPO_4 von Riedel de Haen AG, Seelze,

Katalase und Cytochrom c von C. F. Boehringer und Söhne GmbH, Mannheim,

Hämin, pur. crist. von Dr. Hobein und Dr. Bender AG, Zürich,

Hämoglobin (vom Rind) von Serva, Heidelberg.

Sämtliche Sideramine und die Antibiotika A22765 und Ferrimycin A wurden dem Bestand des Instituts entnommen.

2.3. Nährmedien

Basalmedium:

Zum Wuchsstofftest und zum Versuch zur Änderung der Katalaseaktivität durch Sideramine wurde das definierte Basalmedium (Demain und Hendlin, 1959) mit folgenden Änderungen verwendet:

Ammoniumformiat, Purin- und Pyrimidinsalze wurden durch Ammoniumacetat und Hefe-RNS ersetzt. Bei dem Versuch zur Klärung des Zusammenhangs zwischen Sideraminabhängigkeit und Impfdichte wurde statt einzelner Aminosäuren ein Caseinhydrolysat (Casaminoacids, Difco) in die Nährlösung gegeben, und die fehlenden Aminosäuren wurden hinzugefügt.

Glucose, Aminosäuren, anorganische Salze und Vitamine wurden in getrennten Gruppen autoklaviert und nach dem Abkühlen vereinigt.

Hefeextrakt-Pepton-Medium (HP-Medium):

Dieses Medium wurde zum Vorkultivieren von Microbacterium lacticum für die oben genannten Versuche verwendet. Es besteht aus:

Hefeextrakt	1	%
Pepton	1	%
Glucose	1	%
NaCl	0,5	%
K_2HPO_4	0,1	%
dest. Wasser	1	l

Fleischextrakt-Medium (F-Medium):

Zum Antagonismustest wurde dieses Medium mit folgenden Bestandteilen benutzt:

Fleischextrakt	3	g
Pepton	3	g
NaCl	2,5	g
dest. Wasser	1	l

Zur Herstellung der Agarplatten und Schrägröhrchen erhielten die Nährlösungen einen Agarzusatz von 2 %. Der pH-Wert wurde bei allen Medien auf 7,2 eingestellt. Zur Sterilisation wurden die Gefäße und Nährlösungen 20 Minuten bei 120° C autoklaviert. Für Vitaminlösungen wurde die Sterilisationszeit auf 7 Minuten abgekürzt.

2.4. Methoden

2.4.1. Inkubationsbedingungen

Die Inkubationstemperatur war bei allen Versuchen 37° C. Die Submerskulturen wurden in Erlenmeyer-Kolben, mit einem seitlichen Einstich versehen, auf rotierender Schüttelmaschine mit 120 Umdrehungen/Minute inkubiert. Das entspricht einem Sauerstoffübergang von 35 mMol/l/h, wenn der Kolben 120 ml Lösung enthält. In den Biophotometer-Küvetten wurde die Belüftung durch maximale Amplituden der Magnetrührer erzielt.

Zur Stammerhaltung bei Microbacterium lacticum wurden 120 ml einer gutgewachsenen Kultur (in der Mitte der log-Phase) abzentrifugiert. Nach dem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die Zellen in 5 ml sterilem Humanserum (Firma Grifols, Dubernard, Saarbrücken) mit 5 %igem Glucosezusatz aufgenommen, in kleine Röhrchen verteilt und lyophilisiert (Lyophilisator L2 der Firma Brandau bei Darmstadt). Dann wurden die Röhrchen unter Vacuum (0,05 Tor) zugeschmolzen und bei 4° C aufbewahrt.

Zur Anzucht wurde jeweils der Inhalt eines Röhrchens in 100 ml Ferrioxamin B-haltigem HP-Medium suspendiert, und nach 15 Stunden Inkubationszeit (Mitte der log-Phase) wurden die Bakterien auf HP-Agarröhrchen, auf deren Oberfläche 0,01 ml einer Ferrioxamin B-Lösung (100 µg/ml) verteilt worden war, überimpft. Nach zweitägiger Inkubation wurden diese Röhrchen wie üblich bei 4° C aufbewahrt.

2.4.2. Herstellung der Testlösungen

Mycobactin P wurde in Äthanol gelöst. Nach dem Zusatz von $FeCl_3$ (wäßrige Lösung in äquivalenter Menge) erschien die rote Farbe des Fe-Komplexes.

Ferrioxamin E ist in Eisessig löslich. Es wurde in einem Tropfen Eisessig gelöst und mit destilliertem Wasser bis zur gewünschten Konzentration verdünnt.

Fe-EDTA wurde aus Titriplex III und $FeCl_3$-Lösung hergestellt. Wegen der relativ geringen Löslichkeit im Wasser konnte nur eine Konzentration von 1 mg/ml an Fe-EDTA erreicht werden. Hämin und Katalase ließen sich nur in leicht alkalischem Milieu lösen. Zur Einstellung wurde 0,1 normale NaOH verwendet.

Die Konzentrationen aller Siderochromlösungen wurden colorimetrisch (Photometer Eppendorf, bei 436 nm) gemessen. Die Reinheit der Substanzen wurde chromatographisch auf Kieselgel G-Platten geprüft. Als Laufmittel diente das System Butanol-1, Eisessig, Wasser im Verhältnis 4 : 1 : 1. Für die Rf-Werte vgl. Müller (1968) und Diekmann (1969). Zum Kreuztest konnten unsterile Lösungen verwendet werden. Für die übrigen Versuche wurden die Lösungen je nach Hitzeempfindlichkeit durch Autoklavieren oder sterile Filtration keimfrei gemacht. Das Antibiotikum A22765, ein vorgereinigtes Rohprodukt, ist gut wasserlöslich.

2.4.3. Kreuztest

Der Test wurde nach Zähner et al. (1960) mit den Mikroorganismen Staphylococcus aureus (Tü 202) und Bacillus subtilis (Tü 203) auf F-Agar-Platten durchgeführt. Bei dem ersten Stamm wurden vegetative Keime aus einer wachsenden Kultur (4 ml/100 ml Agar) und bei dem zweiten Sporen (10^8 Sporen/100 ml Agar) in die Oberschicht der Platten zugesetzt.

Über die Diffusionsverhältnisse und die Auswertung des Testes vgl. Poralla (1967).

2.4.4. Antagonismustest im flüssigen Medium

Dieser Test wurde - ebenso wie die nachfolgenden Versuche - im Biophotometer (Fa. Jouan, Paris) ausgeführt. Das Prinzip der Biophotometer-Versuche besteht darin, daß die Trübung der in sechs Küvetten eingefüllten Kulturen kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet wird. Zu Beginn des Versuches wird die Transmission auf 100 % eingestellt, und sie nimmt mit Zunahme der Zellzahl entsprechend ab. Die Magnetrührer in den Küvetten dienen gleichzeitig zur Belüftung und zur homogenen Verteilung der suspendierten Teilchen in dem durchleuchteten Feld. Eine ausführliche Beschreibung des Gerätes gibt die Arbeit von Coultas und Hutchison (1962), wobei zum ersten Mal ein Biophotometer verwendet wurde.

Da die Zellzahl der Extinktion proportional ist, wurden zum Vergleich der Wachstumskurven die Transmissionswerte stets in Extinktion umgerechnet.

Zum Antagonismustest dienten 15 Stunden-alte Schüttelkulturen von Staphylococcus aureus als Impfmaterial. 0,1 ml dieser Kultur wurde in 50 ml Nährlösung (für diese Versuchsreihe F-Medium) einpipettiert. So erhielt die Lösung eine optische Dichte von 0,02 bis 0,03. Die Trübung wurde im Photometer Eppendorf bei 578 nm (Rechteckblende 1770) gemessen.

Zur Bestimmung der minimalen Hemmdosis des Antibiotikums A22765 für den Versuchsorganismus wurden die Küvetten mit verschiedenen Konzentrationen (3, 10, 30, 50 und 100 µg/ml) eingesetzt. Eine Küvette ohne Antibiotikum zeigte das normale Wachstum.

Bei den weiteren Versuchen waren die Zutaten der Küvetten folgende:

Küvette 1 ohne Zusätze als Wachstumskontrolle

Küvette 2 mit 50 µg/ml Antibiotikum A22765 (minimale Hemmdosis) als Kontrolle

Küvetten 3 bis 6 erhielten das Antibiotikum in gleicher Konzentration wie bei Kontrolle und zusätzlich Sideramin oder organische Fe-Komplexe (zur Prüfung der antagonistischen Wirkung) in steigenden Konzentrationen.

2.4.5. Sideramin-Sideromycin-Antagonismus nach Vorinkubation der Zellen mit dem Antibiotikum

Der Versuch wurde auf gleiche Weise wie bei 2.4.4. mit Staph. aureus in F-Medium ausgeführt. Im Gegensatz dazu wurde hier das Sideramin nach einer Inkubation der Zellen mit dem Antibiotikum zugegeben. Der Versuch wurde mit 4 Kontroll-Kulturen in Biophotometerküvetten nach folgender Anordnung eingesetzt:

Küvetten 1 und 2 als Wachstums- und Antibiotikumskontrollen (vgl. Antagonismustest)

Küvetten 3 und 4 als Kontrollen zu der Ferrioxamin B-Wirkung. Sie erhielten 50 µg/ml A22765 und gleichzeitig Ferrioxamin B in Konzentrationen von 10 und 20 µg/ml.

Küvetten 5 und 6 mit den Versuchskulturen erhielten zunächst nur Antibiotikum in gleicher Konzentration wie 2 bis 4. Nach einer zweistündigen Inkubation wurde auch diesen Kulturen Ferrioxamin B in gleicher Konzentration wie bei 3 und 4 zugeführt. Dann wurden die Küvetten weiter inkubiert.

Alle Biophotometer-Versuche galten beendet, wenn bei der Küvette als Wachstumskontrolle das Minimum an Transmission erreicht war.

2.4.6. Wuchsstofftest

Microbacterium lacticum wurde in HP-Medium gezüchtet. Vier bis fünf Tage alte Kulturen, die sich in Ruhephase befanden, wurden abzentrifugiert und die Zellen dreimal jeweils mit 100 ml 0,2 m K_2HPO_4-Lösung gewaschen, in sterilem Wasser resuspendiert und solange verdünnt, bis im Photometer Eppendorf bei 546 nm eine Extinktion von 2 bis 2,2 gemessen wurde.

50 ml Basalmedium wurden mit der vorbereiteten Bakteriensuspension beimpft, so daß die Lösung eine optische Dichte von 0,04 bis 0,05 besaß. Die Biophotometerküvetten wurden nun mit 8 ml dieses beimpften Basalmediums gefüllt, Sideraminlösungen entsprechend den unten angegebenen Konzentrationen zugesetzt und im Biophotometer inkubiert.

Küvette 1	kein Sideraminzusatz (1. Kontrolle)
Küvette 2	0,01 µg/ml Ferrioxamin B
Küvette 3	0,03 µg/ml Ferrioxamin B
Küvette 4	0,1 µg/ml Ferrioxamin B
Küvette 5	0,3 µg/ml Ferrioxamin B
Küvette 6	unbeimpfte Nährlösung (2. Kontrolle)

Für andere Testsubstanzen war die zweite Kontrolle eine beimpfte Nährlösung mit 0,3 µg/ml Ferrioxamin B als Vergleichssubstanz.

2.4.7. Versuch zum Zusammenhang zwischen Impfdichte und Sideraminabhängigkeit bei M. lacticum

Die Anzucht erfolgte unter ausreichender Sideraminversorgung. Die Bakterien wurden in HP-Medium, das 0,01 µg/ml Ferrioxamin B enthielt, überimpft.

In der Mitte der log-Phase (nach 18 bis 20 Stunden) wurde die Kultur abzentrifugiert, die Zellen wurden zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und im gleichen Volumen dieser Lösung aufgenommen. Eine 1 : 10-Verdünnung dieser Suspension hatte eine Extinktion von 0,5 (Photometer Eppendorf, 578 nm). Aus dieser Suspension wurden zwei Verdünnungen hergestellt:

Verdünnung a: (1 ml+ 5 ml phys. Kochsalzlösung) Extinktion 0,8
Verdünnung b: (1 ml der Verd. a + 9 ml Saline) Extinktion 0,08

Als sideraminfreie Nährlösung wurde auch bei diesem Versuch Basalmedium verwendet.

Von Ferrioxamin B wurden autoklavierte Lösungen mit Konzentrationen von 300 µg/ml (Lösung a) und 1000 µg/ml (Lösung b) hergestellt.

Die Biophotometerküvetten wurden angesetzt, wie im nachstehenden Schema dargestellt:

Küvette Nr.	Basalmedium ml	Bakteriensuspension, Verdünnung a oder b, ml	Ferrioxamin B-Lösung a oder b, ml
1	8,0	-	-
2	7,2	b 0,8	-
3	7,2	b 0,8	a 0,08
4	7,2	b 0,8	b 0,08
5	7,2	a 0,8	-
6	7,2	a 0,8	b 0,08

2.4.8. Änderung der Katalaseaktivität durch Sideramine

Microbacterium lacticum wurde mit geringer Sideraminversorgung (5 µg/l HP-Medium) gezüchtet. Die Zellen - gewonnen aus 800 ml Kultur - wurden zweimal jeweils mit 100 ml 0,2 m K_2HPO_4-Lösung gewaschen und in 200 ml Basalmedium suspendiert. Die Suspension wurde auf acht 100 ml-Erlenmeyer-Kolben, die mit einem seitlichen Einstich versehen waren, verteilt. Vier von diesen Kolben erhielten zusätzlich Ferrioxamin B in einer Konzentration von 1 µg/ml. Die vier restlichen bildeten bei dem weiteren Versuchsvorgang die sideraminfreien Kontroll-Proben. Alle Kolben wurden inkubiert. Nach 30, 60, 90 und 120 Minuten wurden jeweils zwei Kolben, mit und ohne Ferrioxaminzusatz, in ein Eisbad gestellt. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen aus den acht verschiedenen Kolben von der Nährlösung getrennt, je in 8 ml Phosphat-Puffer aufgenommen und zum Aufschluß beschallt (Ultraschallgerät der Fa. Branson, Stufe 4, 4 Minuten für jede Probe).

Der lösliche Proteinextrakt wurde von den Zelltrümmern durch Zentrifugieren (10 Minuten bei 48200 g und 0° C) getrennt und zur Katalasebestimmung verwendet (Salton und Freer, 1965).

Im Vorversuch wurde geprüft, ob die Extraktion durch Ultraschallwellen bei Suspension mit gleicher Zellzahl unter gleichen Bedingungen die gleiche Konzentration von löslichem Protein ergibt.

Die Aufarbeitung erfolgte wie bei dem Hauptversuch, nur wurden hier Zellen direkt einer Vorkultur entnommen. Nach der Aufnahme der Zellen in Phosphat-Puffer wurde die Suspension in Zentrifugeröhrchen gleichmäßig verteilt und wie beschrieben beschallt.

Es galt auch bei dem Hauptversuch, daß das Gerät nach je 2 Minuten ausgeschaltet und abgekühlt werden mußte. Ebenso wurde die Suspension während der Behandlung ins Eisbad (Salzgemisch) gestellt, um die Temperatur niedrig zu halten. Die weitere Bearbeitung der Proben und die Proteinbestimmung waren ähnlich wie beim Hauptversuch.

Bestimmung der Katalaseaktivität

Die Bestimmung erfolgte nach H. Lück (1962) und Bergmeyer (1955) spektralphotometrisch (Spektralphotometer PMQ II, Fa. Zeiss). Das Absorbtionsmaximum einer H_2O_2-Lösung liegt bei 240 nm. Die Extinktion nimmt infolge der Katalasewirkung ab. Die Geschwindigkeit dieser Abnahme ist von der Katalaseaktivität abhängig. Es wird die Zeit gemessen (Δt), in der ein bestimmter Abfall der Extinktion (ΔE) stattfindet. Zur Vereinfachung der Rechnungen ist ΔE auf den Extinktionsbereich 0,450 zu 0,400 festgelegt. Man geht von einer H_2O_2-Konzentration aus, deren Extinktion etwa 0,500 beträgt. Die Katalaseaktivität k wird nach folgender Formel berechnet:

$$k = \frac{2,3}{\Delta t} \cdot \log \frac{0,450}{0,400} = \frac{0,1175}{\Delta t} \cdot \sec^{-1}$$

Umrechnung nach Bergmeyer-Einheiten: $\frac{k}{6,93 \cdot 10^{-3}}$

Proteinbestimmung

Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität wurde der Proteingehalt der Extrakte colorimetrisch mit dem Photometer Eppendorf bestimmt. Für die Konzentrationen bis 100 µg/ml wurde die Methode nach Lowry et al. (1955) verwendet. Bei höheren Konzentrationen diente die Biuret-Reaktion zur Bestimmung.

3. Ergebnisse

Wie bei der Problemstellung erläutert, wurden die zum Test verwendeten Substanzen so ausgewählt, daß die verschiedenen Typen von Komplexbildnern jeweils mindestens mit einem Vertreter beteiligt waren.

Hauptgruppen waren die Hydroxamsäuren und die Nicht-Hydroxamsäuren. Die erste Gruppe war zu unterteilen:

a) Trihydroxamsäuren:
Ferrioxamine B und E, Ferrichrom, Ferrichrysin, Ferrirubin, Coprogen, Coprogen B und Fusigen

b) Dihydroxamsäuren:
Terregens-Faktor, Ferribactin, Mycobactin P und Dimerumsäure

c) Monohydroxamsäuren:
Fusarinin, Fe-acethydroxamat

Als Nicht-Hydroxamsäuren waren Fe-citrat, Fe-EDTA, Hämin und die Hämoproteine Hämoglobin, Cytochrom c, Katalase und Ferredoxin vertreten.

Für die Wahl der Testorganismen waren folgende Überlegungen maßgebend: Die Sideromycine der Gruppen 1 und 2 (Einteilung nach Bickel, 1960) wirken auf grampositive Bakterien. Daher sind die Mikroorganismen Staphylococcus aureus und Bacillus subtilis für den Antagonismustest geeignet. Andererseits kann nach Zähner et al. (1963) nur bei Staph. aureus eine kompetitive Aufhebung der Sideromycinwirkung durch Sideramine beider Typen (Ferrioxamin und Ferrichrom) beobachtet werden.

3.1. Antagonismus auf Agarplatten

Die mit dem Antibiotikum A22765 erhaltenen Daten aus dem Kreuztest mit Staph. aureus lassen sich in folgender Tabelle zusammenstellen:

Tabelle 1: Kreuztest mit Antibiotikum A22765 und Staph. aureus

Substanzen [1]	c Antagonist/ c Antibiotikum (Gew./Gew.) [2]	Prozent Aktivität (bezogen auf Fe-Gehalt) [3]
Ferrioxamin B	0,2	100
Ferrioxamin E	1	20
Ferrichrysin	2	14
Ferrirubin	5	6
Ferrichrom A	40	-
Fusigen	40	0,7
Coprogen	100	0,3
Coprogen B	40	0,7
Terregens-Faktor	1,2	20
Mycobactin P	10	-
Dimerumsäure	40	0,5
Fusarinin	40	-
Fe-acethydroxamat	40	-
Fe-citrat	40	-
Fe-EDTA	40	-
$FeCl_3$	40	-
Hämin	100	-
Hämoglobin	100	-
Katalase	100	-
Cytochrom c	100	-

- bedeutet: keine antagonisierende Wirkung beobachtet

In der Spalte 2 der Tabelle ist das in dem Versuch verwendete Konzentrationsverhältnis Antibioticum / Antagonist eingetragen. Spalte 3 zeigt die prozentuale Aktivität der getesteten Substanzen im Vergleich mit dem Ferrioxamin B. Bei diesem Vergleich wurde - wie auch bei den weiteren Testverfahren -

das Verhältnis Eisengewicht pro Molgewicht berücksichtigt.

Im Vorversuch wurde für einige Sideramine die Abhängigkeit der Hemmstrecke von der Konzentrationshöhe auf halblogarithmischem Papier dargestellt. Während bei Ferrioxamin B eine Gerade entsteht, nimmt die Steigung der Sideramine des Ferrichrom-Typs oberhalb einer bestimmten Konzentration ab (vgl. Abb. 7 beim Versuch mit B. subtilis).

Der Vergleich der wirksamen Konzentration konnte in diesem Fall mit Hilfe einer Linie parallel zur X-Achse, die alle Kurven traf, erfolgen.

Die erhaltenen relativen Werte für die Sideramine von Ferrichrom-Typ waren niedriger als die, die von anderen Autoren, allerdings mit Ferrimycin, ermittelt wurden. Daher wurde der Versuch wiederholt und neben dem Antibiotikum A 22765 auch Ferrimycin A zum Test verwendet. Das unterschiedliche Verhalten der Sideramine gegenüber diesen Antibiotica wurde dadurch bestätigt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Relative Wirksamkeit der Sideramine im Kreuztest mit Staph. aureus

Sideramine	Antibiotica	
	A22765	Ferrimycin A
Ferrioxamin B	= 100 %	= 100 %
Ferrichrom	23	89
Ferrichrysin	32	69
Ferrirubin	10	33
Coprogen	0,12	2,1
Fusigen	0,1	1,0
Coprogen B	0,03	0,6
Dimerumsäure	0,02	0,4

Ein weiterer Versuch hat gezeigt, daß die Verhältnisse anders sind, wenn anstatt Staph. aureus Bacillus subtilis als Versuchsorganismus dient (Tabelle 3).

Tabelle 3: Relative Wirksamkeit von Sideraminen im Kreuztest mit B. subtilis

Sideramine	Antibiotica A22765	Ferrimycin A
Ferrioxamin B	= 100 %	= 100 %
Ferrichrom	-	93
Ferrichrysin	-	40
Ferrirubin	-	8
Coprogen	-	1,5
Fusigen	-	-
Coprogen B	-	-
Dimerumsäure	-	0,2

- bedeutet, daß mit einer Konzentration von 10 mg/ml keine meßbare Aufhebung beobachtet wurde

Man kann die Unterschiede, die bei den Ergebnissen mit den beiden Versuchsorganismen auftreten, in drei Punkten zusammenfassen:

a) Das Ferrimycin A wird bei beiden Organismen von den Sideraminen in ähnlicher Weise antagonisiert, d.h. die prozentualen Aktivitätsverhältnisse bleiben im Vergleich mit Ferrioxamin B ungefähr gleich.

b) Die Wirkung des Antibiotikums A22765 wird bei beiden Organismen von Ferrioxamin B stark aufgehoben. Die Pilzsideramine jedoch zeigen mit Staph. aureus nur um 50 % der Aktivität, die sie gegen Ferrimycin A aufweisen. Mit Bacillus subtilis sind deren Aktivitäten noch niedriger, so daß in den eingesetzten Konzentrationen (10 mg/ml) keine meßbare Aufhebung zustande kam.

c) Die Sideramine Fusigen und Coprogen B erschienen bei dem Test mit Bacillus subtilis (ebenso in Konzentrationen von 10 mg/ml) gegenüber beiden Antibiotica als völlig inaktiv.

Die Abhängigkeit der antagonistischen Wirkung von der Konzentration des Sideramins bildet ein Charakteristicum für verschiedene Typen dieser Klasse. Diese wurde bei dem Kreuztest sowohl mit Staph. aureus als auch mit Bacillus subtilis festgestellt (vgl. Seite 27 und bei Wuchsstofftest).

In Abbildung 7 ist für einige Sideramine die Abhängigkeit der Aufhebungsstrecke von der Konzentration auf halblogarithmischem Papier dargestellt (beim Kreuztest, einer Variante des Plattendiffusionstests, ist die Hemmstrecke dem Logarithmus der Konzentration proportional).

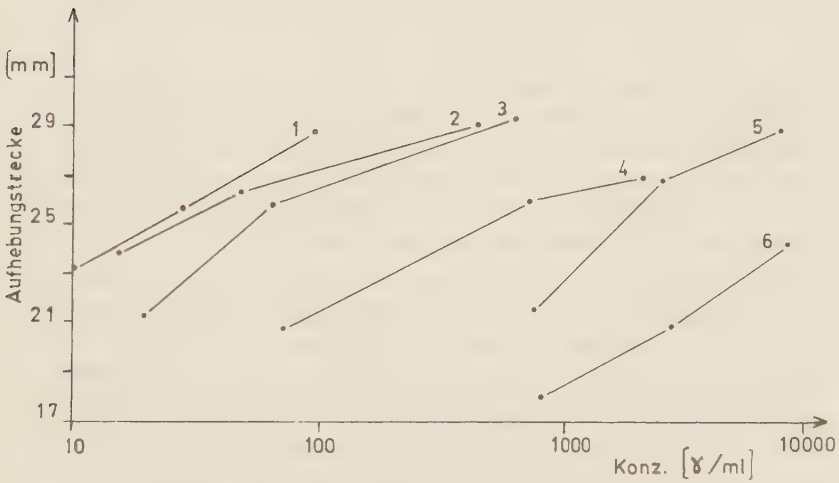

Abb. 7: Abhängigkeit der antagonistischen Wirkung von der Konzentration des Sideramins beim Kreuztest mit B. subtilis und Ferrimycin A
1: Ferrioxamin B, 2: Ferrichrom, 3: Ferrichrysin, 4: Ferrirubin, 5: Coprogen, 6: Dimerumsäure.

3.2. Antagonismus im flüssigen Medium

Die minimale Hemmdosis (MID) von Antibiotikum A22765 für Staph. aureus bei einer Impfdichte, die eine Extinktion von 0,03 gegen unbeimpfte Nährlösung hat, liegt bei 50 ug/ml.

Die Sideramine wurden zunächst mit Konzentrationen zum Test angesetzt, die aus den Ergebnissen des Kreuztestes zu errechnen waren. Bei solchen Verbindungen, die im Kreuztest inaktiv waren, wurden die für den Versuch geeigneten Konzentrationen in Vorversuchen bestimmt.

Aus den erhaltenen Kurven waren abzulesen:

a) ob die Testsubstanz die Wirkung des Antibiotikums antagonisiert,

b) die Konzentration, bei der der Antagonist seine maximale Wirkung aufweist,

c) die prozentuale Wiederherstellung des Wachstums im Vergleich mit der Wachstumskontrolle.

Eine vollständige Aufhebung, wobei die Kulturen mit Antibiotikum- und Antagonisten-Zusatz genauso stark wachsen sollten, wie die normale Kultur, wurde nicht beobachtet. Bei Ferrioxamin B, als aktivster Substanz, konnte mit einer Konzentration von 10 µg/ml 90 % des Wachstums wieder hergestellt werden. Höhere Konzentrationen zeigten keine erhöhte Wirkung.

Auch bei diesem Test gilt das Konzentrationsverhältnis Antagonist / Antibiotikum als Maß für die Wirkung der getesteten Substanz. Da das Antibiotikum bei allen Versuchen mit gleicher Konzentration vorlag (= MID), sind die wirksamen Konzentrationen der Antagonisten direkt miteinander zu vergleichen (Tabelle 4 2).

Zum Vergleich mit Ferrioxamin B wurden zwei Faktoren berücksichtigt:

a) das Verhältnis Eisen-Gewicht / Molgewicht,

b) prozentuale Wiederherstellung des Wachstums.

Tabelle 4: Antagonismustest in Submerskultur mit Antibiotikum A22765 und Staph. aureus

Substanzen [1]	c Antagonist/ c Antibiotikum (bezogen auf Fe-Gehalt) [2]	Prozent Wachstum wiederhergestellt * [3]	Prozent relative Aktivität ** [4]
Ferrioxamin B	1	90	100
Ferrioxamin E	2	90	50
Ferrichrysin	10	90	10
Ferrirubin	10	80	9
Ferrichrom A	10	-	-
Fusigen	40	20	0,5
Coprogen	40	5	0,1
Coprogen B	30	30	1
Terregens-Faktor	10	60	7
Mycobactin	10	5	0,6
Dimerumsäure	40	20	0,5
Fusarinin	100	-	-
Fe-acethydroxamat	200	50	0,3
Fe-citrat	100	10	0,1
Fe-EDTA	40	-	-
$FeCl_3$	40	-	-
Hämin	40	-	-
Hämoglobin	100	-	-
Katalase	100	-	-
Cytochrom c	100	-	-

*) Extinktion der Versuchskulturen / Extinktion der Wachstumskontrolle

**) Diese wurde aus dem Quotient $\frac{3}{2} \cdot \frac{100}{90}$ berechnet.

Hier wurde die Wachstumshöhe, die durch die antagonistische Wirkung von Ferrioxamin B erreicht wurde (d.h. 90 % des normalen Wachstums) als höchster Wert gleich 100 % gesetzt. Bei der Berechnung der relativen Aktivität der übrigen Verbindungen (Tabelle 4 [4]) wurde dann der Faktor $\frac{100}{90}$ berücksichtigt.

Als Beispiel für die erhaltenen Kurven wird in Abbildung 8 der Versuch mit Ferrioxamin E als Antagonist wiedergegeben.

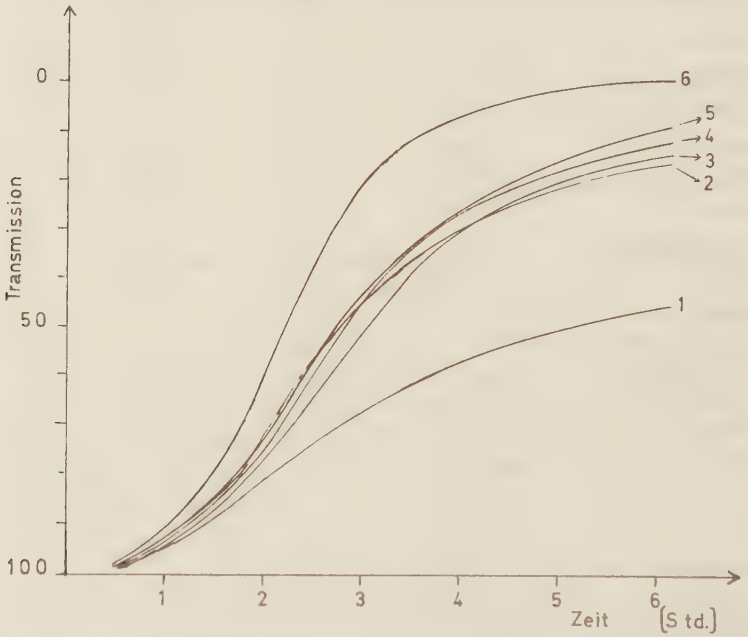

Abb. 8: Antagonismustest in flüssiger Kultur mit Staph. aureus
1: enthielt nur Antibiotikum A22765 (50 µg/ml),
2 und 3: erhielten vor dem Antibiotikumszusatz Ferrioxamin E in Konzentrationen von 25 µg/ml, 4 und 5: ähnlich wie 2 und 3 mit 50 µg/ml Ferrioxamin E, 6: Wachstumskontrolle ohne jeglichen Zusatz

3.3. Sideramine als Wuchsstoffe für Microbacterium lacticum

Ebenso wie beim Antagonismustest wurden die Wachstumskurven von dem Biophotometer aufgezeichnet. Die Wirkung der verschiedenen Sideramine wurde auf folgende Weise mit der Wirkung von Ferrioxamin B verglichen:

a) Höhe des Wachstums zu einem Zeitpunkt, in dem 20 % der Transmission bei der Kontrollkultur noch vorhanden ist (Tabelle 5 [2]; vgl. Methoden S. 19).

b) Anstieg der Kurven in der exponentiellen Phase als Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit und Dauer dieses Stadiums (Tabelle 5 [3]).

c) Abhängigkeit des Wachstums von der Konzentration der getesteten Verbindung (Abb. 10).

Die in der Tabelle 5 eingetragenen Daten sind Mittelwerte aus jeweils 3 bis 5 Wiederholungen. Eine starke Streuung zeigten die Versuche mit Fe-EDTA.

Hier soll erwähnt werden, daß der Stamm seine Sideraminabhängigkeit leicht verliert und dadurch viele Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung bereitet. Nur unter gewissen Bedingungen war der Organismus absolut sideraminbedürftig, so daß in sideraminfreiem Medium absolut kein Wachstum möglich war (vgl. auch das Kapitel 3.6.).

Alle untersuchten Verbindungen außer Fusarinin zeigten eine Aktivität, die im allgemeinen viel höher war als bei den zwei beschriebenen, auf dem Antagonismus beruhenden Testverfahren. Die geringsten Aktivitäten wiesen Hämoproteine auf, nämlich 1/100 der Ferrioxamin B-Wirkung.

Beachtenswert ist, daß die Trihydroxamsäuren aus der Ferrichrom-Gruppe die Wachstumsgeschwindigkeit der exponentiellen Phase stärker beeinflussen als die absolute Wachstumshöhe, wie es aus der Tabelle 5 zu entnehmen ist.

Tabelle 5: Wuchsstofftest mit Microbacterium lacticum

Fe-Verbindungen [1]	relative Wachstumshöhe [2]	relative Wachstumsgeschwindigkeit in der log-Phase [3]
Ferrioxamin B	100	100
Ferrioxamin E	98	98
Ferrichrysin	80	94
Ferrirubin	50	56
Ferrichrom	67	80
Fusigen	42	50
Coprogen	90	90
Coprogen B	63	70
Terregens-Faktor	77	70
Ferribactin	60	60
Dimerumsäure	37	17
Fusarinin	-	-
Fe-acethydroxamat	49	50
Fe-citrat	10	1
Fe-EDTA	50	x
Hämin	1	1
Hämoglobin	2	1
Katalase	3	1,6
Cytochrom c	1	2
Ferredoxin	1	0,1

x Wegen starker Streuung der Ergebnisse bei Parallelbestimmungen konnte kein verläßlicher Wert ermittelt werden.

Ein weiteres Merkmal bildet die Abhängigkeit des Wachstums von der Konzentration des Wuchsstoffes. Sie war für jede Substanz spezifisch. Beim Übertragen in ein Koordinatensystem entstanden für verschiedene Verbindungen typische Kurven (Alexanian, 1968).

In Abb. 9 wird die Wirkung von Ferrioxamin B auf das Wachstum von Microbacterium lacticum in verschiedenen Konzentrationen wiedergegeben.

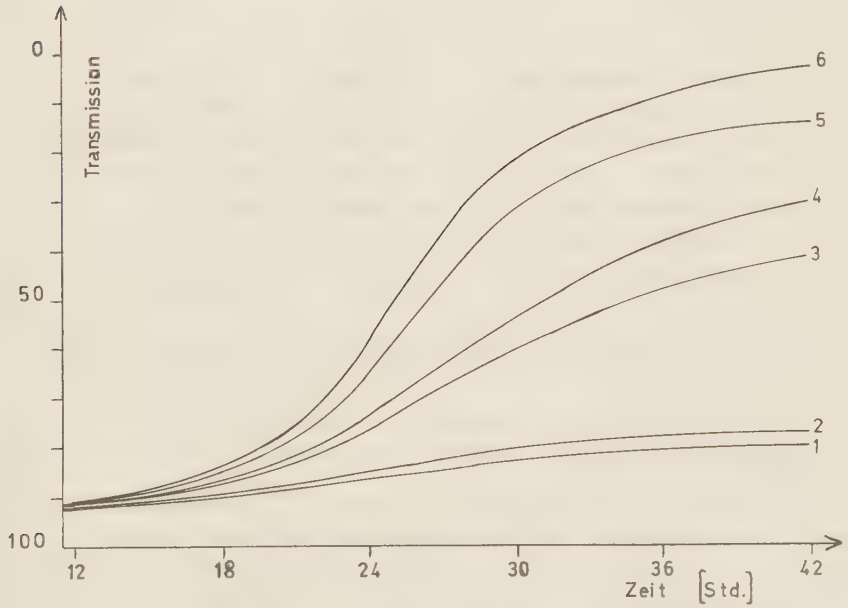

Abb. 9: Wuchsstofftest mit Microbacterium lacticum in Basalmedium
1: unbeimpfte Nährlösung;(2 bis 6: beimpfte Kulturen), 2: ohne Ferrioxamin B-Zusatz, 3: 0,01 µg/ml, 4: 0,03 µg/ml, 5: 0,1 µg/ml und 6: 0,3 µg/ml Ferrioxamin B

3.4. Zusammenhang zwischen Impfdichte und Sideraminabhängigkeit bei Microbacterium lacticum

Wie schon erwähnt, bereitet Microbacterium lacticum Schwierigkeiten bei der Standardisierung des Wuchsstofftestes. Wir haben beobachtet, daß das Alter der Schrägröhrchen, die zum Impfen der Vorkulturen verwendet wurden, für die Empfindlichkeit der Zellen in den Versuchskulturen von Bedeutung ist. Wurde die Vorkultur aus einem frischen Röhrchen (ein Tag bis eine Woche alt) beimpft, so ist dieses Material nach 4 Tagen für die Biophotometerkulturen geeignet (s. Versuchsanordnung im experimentellen Teil), d. h. der Organismus war stark sideraminbedürftig und reagierte auf die zugegebenen Testsubstanzen.

Anders war es der Fall, wenn die Vorkultur von einem 3 bis 4 Wochen alten Röhrchen beimpft wurde. Die Zellen, die nach 4 Tagen Inkubation abgetrennt, gewaschen und als Impfmaterial zum Biophotometerversuch verwendet wurden, zeigten keine Sideraminabhängigkeit. Sie wuchsen in sideraminfreiem Basalmedium verhältnismäßig gut, und es war keine oder nur eine schwache Reaktion auf den zugefügten Wuchsstoff zu sehen.

Es schien, als hätte sich der Wuchsstoffbedarf im Laufe der Zeit geändert.

Aufgrund der Beobachtungen von Lankford et al. (1966) bestand jedoch die Möglichkeit, daß die Zahl der lebenden Zellen, die beim Überimpfen jeweils in die Kultur eingesetzt wurden, die eigentliche Ursache dieser Änderung sein könnte.

Nach dieser Überlegung wurden die Kulturen mit verschiedener Impfdichte jeweils mit und ohne Sideramin-Zusatz zum Versuch eingesetzt und deren Wachstum in Abhängigkeit von den beiden Faktoren aufgezeichnet. Die so erhaltenen Kurven sind in Abb. 10 wiedergegeben.

Aus dem Verlauf der Kurven ist folgendes zu ersehen:

a) Das Wachstum von Microbacterium lacticum ist in sideraminfreiem Medium von der Impfdichte abhängig.

b) Mit größerem Inoculum (Extinktion = 0,08 entspricht ungefähr 10^7 Zellen/ml) wächst der Stamm gut und zeigt keine Abhängigkeit von den Sideraminen.

c) Bei geringer Impfdichte (1 : 10 der oben angegebenen) bleibt das Wachstum zurück,und entsprechend steigt die Empfindlichkeit gegen Sideramine.

d) Bei Kulturen, die ohne Sideramin und nur durch hohe Impfdichte wachsen, ist die lag-Phase sehr kurz. Das Wachstum beginnt nach dem Beimpfen und steigt allmählich bis zum Maximum an. Dünn beimpfte Kulturen, die zu Beginn des Versuches Sideramin erhielten, zeigen dagegen eine lange lag-Phase, dann eine relativ steile log-Phase, die ungefähr zur gleichen Zeit wie bei den erstgenannten Kulturen zum Maximum führt. Die absolute Wachstumshöhe der Kulturen in Küvette 3 und 4 ist größer als die der Kulturen in Küvetten 5 und 6.

e) In bezug auf die Sideramine (und nicht auf den Stamm) ist bemerkenswert, daß über eine bestimmte Konzentration hinaus keine Steigerung der wachstumsfördernden Wirkung zu beobachten ist.

f) Die Absorption der Nährlösung bleibt während der Inkubation unverändert.

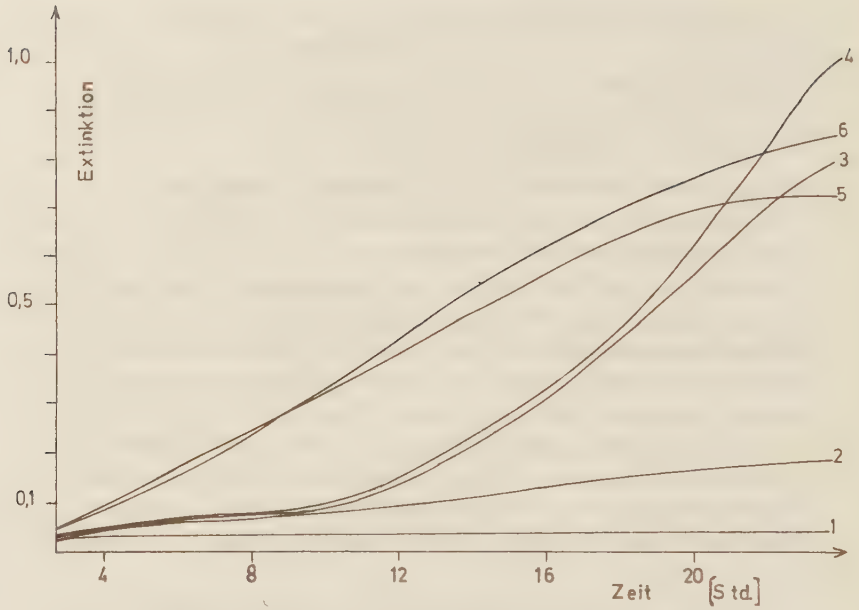

Abb. 10: Wachstum von Microbacterium lacticum in Basalmedium bei verschiedenen Impfdichten, mit und ohne Zusatz von Ferrioxamin B
1: unbeimpfte Nährlösung, 2-4: beimpft mit geringer Impfdichte, 2: ohne Sideramin, 3 und 4: enthalten 3 und 10 µg/ml Ferrioxamin B, 5 und 6: beimpft mit hoher Impfdichte, 5: enthält 10 µg/ml Ferrioxamin B, 6: ohne Sideramin

3.5. Antagonismus Sideramin/Sideromycin nach Vorinkubation mit dem Antibiotikum

Nach der Hypothese von Zimmermann und Knüsel (1969) (s. Einleitung) sollte ein Antagonismus nur dann stattfinden, wenn die Sideramingabe vor dem Antibiotikumszusatz erfolgt. Geschieht sie nach der Zugabe des Antibiotikums, so wäre keine Aufhebung mehr zu erwarten.

Um zu prüfen, ob diese Überlegung zutrifft, wurden Biophotometerversuche durchgeführt, bei denen den Versuchskulturen

nach einer zweistündigen Vorinkubation mit dem Antibiotikum A22765 Ferrioxamin B zugesetzt wurde. Drei parallel eingesetzte Kontrollen zeigten bei dem Verlauf des Versuches das normale Wachstum, die Wirkung des Antibiotikums und die antagonistische Wirkung von Ferrioxamin B, das hier vor dem Antibiotikum zugegeben war. Die entstandenen Kurven (Abb.11) zeigen, daß das Wachstum bei weiterer Inkubation - nach der Sideramingabe - mit kurzer Verzögerung beginnt und fast die gleiche Höhe erreicht wie bei den Kulturen, die das Sideramin

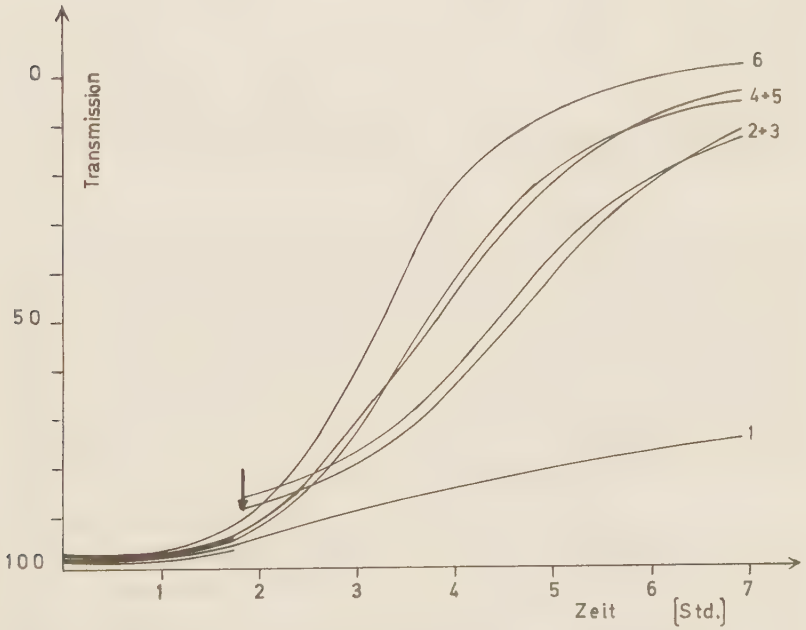

Abb. 11: Wachstum von Staph. aureus in Gegenwart von Antibiotikum A22765 mit vorzeitigem und nachträglichem Zusatz von Ferrioxamin B
1-5: enthalten 50 µg/ml Antibiotikum, 1: ohne Sideramin, 2 und 3: Sideraminzusatz (10 und 20 µg/ml) nach Vorinkubation mit dem Antibiotikum, 4 und 5: Sideraminzusatz (gleich wie 2 und 3) vor dem Antibiotikumszusatz, 6: Wachstumskontrolle

vor dem Antibiotikumszusatz erhielten. In der antibiotikumhaltigen Kultur (Kontrolle), der kein Ferrioxamin B zugesetzt wurde, ist jedoch bis zum Ende der Inkubationszeit nur ein schwaches Wachstum zu beobachten.

3.6. Änderung der Katalaseaktivität durch Sideramine

Bei diesem Versuch sollten zwei Reihen von Enzymextrakten in bezug auf ihre Katalaseaktivitäten verglichen werden. Die erste Reihe entstand aus Zellen, die mit Ferrioxamin B inkubiert wurden, und die zweite aus solchen, die kein Sideramin erhielten.

Die Inkubationszeit wurde nur auf die lag-Phase beschränkt, da nach der Problemstellung eine Steigung der Katalaseaktivität vor dem Wachstumsbeginn zu erwarten war.

Aus der Beschreibung des Versuches im experimentellen Teil wird ersichtlich, daß die Bereitung der Enzymproben über mehrere Stufen verläuft, wobei die Empfindlichkeit des Enzyms ein möglichst rasches Arbeiten erfordert. Aus diesem Grund konnte für jeden einzelnen Fall (Inkubationsdauer und Ferrioxamin-Gehalt) nur eine Probe hergestellt werden. Um die Fehlermöglichkeit zu verringern, wurde der Streuungsbereich für die Menge Protein, die durch Aufschluß der Zellen in die Lösung geht, bestimmt. Er lag bei ± 20 %.

Dagegen zeigten die spektralphotometrisch ermittelten Werte aus wiederholten Messungen bei einer Katalase-Lösung mit bekannter Proteinkonzentration relativ geringe Abweichungen. Daraus muß geschlossen werden, daß die in den drei letzten Spalten der Tabelle 6 auftretende Streuung auf die Extraktionsmethode zurückzuführen ist.

Obwohl der Stamm katalasepositiv ist, war die enzymatische Wirkung bei allen Proben gering.

Tabelle 6: Aktivität der Katalase bei Microbacterium lacticum, gezüchtet in sideraminarmem Basalmedium, nach Inkubation mit oder ohne Ferrioxamin B-Zusatz

Probe Nr. [1]	Inkubation min [2]	Ferrioxamin B * [3]	Δt für ΔE= 0,05 sec [4] **	Katalase-einheiten [5]	Protein-konzen-tration [6]	spezifische Aktivität [7]
1	30	-	140	0,01092	0,475	0,025
2	30	+	135	0,01131	0,510	0,022
3	60	-	220	0,00689	0,560	0,012
4	60	+	200	0,00754	0,520	0,0145
5	90	-	120	0,01170	0,650	0,018
6	90	+	120	0,01170	0,660	0,0178
7	240	+	117	0,01170	0,350	0,0334

*) bedeutet Zusatz von 1 ug/ml Ferrioxamin B während der Inkubation

**) berechnet aus Spalte 4 nach Bergmeyer, vgl. Methoden S. 23

Eine Steigung der Katalaseaktivität infolge des Sideraminzusatzes konnte nicht festgestellt werden. Die mehrfache Wiederholung des Versuches ergab stets ähnliche Ergebnisse. Tabelle 6 zeigt die erhaltenen Werte aus einem Versuch.

4. Diskussion

Bevor die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse über die biologischen Effekte von Sideraminen diskutiert werden, sollen zur besseren Übersicht die in den Tabellen 1, 4 und 5 aufgeführten relativen Aktivitäten gegenüber gestellt werden (Tab. 7).

Die Zahlen in den Spalten 2 und 3 betreffen die Antagonisierung der Sideromycin-Wirkung. Demgegenüber zeigt die Spalte [4] die Wirkung der Eisenkomplexe auf einen sideraminauxotrophen Mikroorganismus.

Die im Kreuztest auf Agarplatten (Antibiotikum A22765, Staph. aureus als Teststamm) erhaltenen Daten über die relative Wirksamkeit der Sideramine stimmen im wesentlichen mit den Ergebnissen von Zähner et al. (1963) überein, d. h., die Sideramine aus Actinomyceten antagonisieren die Wirkung der Gruppen 2 und 3 (Einteilung nach Bickel et al., 1960) bei geringerer Konzentration als die Sideramine aus Pilzen.

Von den Sideraminen aus Bakterien erwies sich der Terregens-Faktor als sehr aktiv, Mycobactin als inaktiv. Fusarinin zeigte ebenso wie die synthetischenMetallkomplexbildner, Hämin und Hämoproteine bei den angegebenen Konzentrationen, die teilweise wegen geringer Löslichkeit der Substanzen nicht weiter erhöht werden konnten, keine aufhebende Wirkung.

Entsprechend ihrer biologischen Aktivität wiesen Zähner et al. (1963) auf folgende Beziehungen zwischen den verschiedenen Siderochromen hin:

Ferrimycine hemmen nur das Wachstum der grampositiven Keime, und die strukturanalogen Ferrioxamine heben deren Wirkung bei diesen Keimen kompetitiv auf.

Das Antibiotikum des Ferrichromtyps, Albomycin, zeigt bei allen von Sideraminen des Ferrichromtyps vollständig antagoni-

Tabelle 7: Relative Aktivitäten von Eisenkomplexen und Eisen(III)-chlorid im Wuchsstofftest mit Microbacterium lacticum sowie im Kreuztest und Antagonismustest in Submerskultur mit Staph. aureus und Antibiotikum A22765

Verbindungen [1]	Kreuztest [2]	Antagonismustest in Submerskultur [3]	Wuchsstofftest [4]
Ferrioxamin B	= 100 %	= 100 %	= 100 %
Ferrioxamin E	20	50	98
Ferrichrysin	14	10	80
Ferrirubin	6	9	50
Ferrichrom	23	x	80
Ferrichrom A	-	-	-
Fusigen	0,7	0,5	42
Coprogen	0,3	0,1	90
Coprogen B	0,7	1	63
Terregens-Faktor	20	7	77
Mycobactin	-	0,6	+
Dimerumsäure	0,5	0,5	37
Fusarinin	-	-	-
Fe-acet-hydroxamat	-	0,3	50
Fe-citrat	-	0,1	10
Fe-EDTA	-	-	50
$FeCl_3$	-	-	-
Hämin	-	-	1
Hämoglobin	-	-	2
Katalase	-	-	3
Cytochrom c	-	-	1
Ferredoxin	-	-	1

- = keine meßbare Wirkung
x = nicht getestet
+ = nach Francis et al. (1953) ersetzt die Verbindung Siderамine bei den auxotrophen Stämmen

siert. Eine vollständige Aufhebung des Albomycins durch Ferrioxamine und ebenso eine vollständige Aufhebung der Ferrimycine durch Sideramine des Ferrichromtyps konnte jedoch nur bei Staph. aureus beobachtet werden.

Ein Vergleich der Tabellen 2 und 3 (S. 27), entstanden aus dem Kreuztest mit Staph. aureus und Bacillus subtilis (Antibiotika A22765 und Ferrimycin A), bestätigt diese Auffassung.

Das Antibiotikum A22765 verhält sich nach diesen Ergebnissen wie ein Sideromycin des Ferrioxamin-Typs. Seine Wirkung wird bei Staph. aureus von allen Sideraminen mehr oder weniger aufgehoben. Bei Bacillus subtilis erzielt nur Ferrioxamin B eine starke Aufhebung, die Pilz-Sideramine haben nur geringen Einfluß.

Ein besonderes Merkmal, das bei dem Test mit B. subtilis auftritt, ist die vermutliche Inaktivierung der Sideramine Fusigen und Coprogen B. Dieses ist für Coprogen und Dimerumsäure nicht der Fall. Nach Diekmann (1970) könnte diese Erscheinung auf den Abbau beider Verbindungen durch hydrolytische Enzyme, die für diesen Stamm spezifisch sind, zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse aus dem Wuchsstofftest (mit Microbacterium lacticum als Versuchsorganismus im Basalmedium) lassen sich mit den bekannten Ergebnissen anderer Autoren, soweit es sich um denselben Versuchsstamm handelt, vergleichen. So wurde in der vorliegenden Arbeit die höchste Aktivität für Sideramine aus Bakterien, die Ferrioxamine, registriert. Das entspricht den Beobachtungen von Zähner et al. (1962). Sideramine des Ferrichrom-Typs beeinflussen mehr als die absolute Wachstumshöhe die Geschwindigkeit der Zellteilung während der exponentiellen Phase. Hendlin und Demain (1959) haben gefunden, daß diese Verbindungen nur die log-Phase abkürzen. Bei den vorliegenden Untersuchungen jedoch waren die Bedingungen so gewählt, daß der Organismus ohne Sideramin nicht wächst.

Neben den Dihydroxamsäuren Dimerumsäure und Mycobactin P zeigten bei diesem Test auch die Komplexe Fe-acethydroxamat, Fe-

EDTA und Fe-citrat stimulierenden Effekt, wie es nach den Berichten von Demain und Hendlin (1959), Ramsey und Lankford (1956), Antoine et al. (1964) und Morrison et al. (1965) zu erwarten war. Für Hämin und Hämoproteine konnten mit Microbacterium lacticum ungefähr 10fach-höhere Aktivitäten ermittelt werden als bei Pilobulus kleinii, bei dem das Coprogen eine 1000fach-höhere Aktivität als Hämin aufweist (Hesseltine et al., 1952).

Fusarinin war auch bei diesem Test wie beim Kreuztest inaktiv (vgl. das Ergebnis von Emery, 1965, an Arthrobacter JG9), ebenso Ferrichrom A, das von Zähner et al. (1963) als inaktiv beschrieben wurde.

Die Ursache für die Inaktivität mag bei Fusarinin in dessen Instabilität liegen. Das zum Test verwendete cis-Fusarinin zerfällt leicht bei pH-Änderungen (Emery, 1965). Bei Ferrichrom A kann die Carboxylgruppe an der Stelle R des Moleküls dafür verantwortlich gemacht werden, daß es im biologischen Test unwirksam ist (s. Emery, 1961).

Beim Vergleich der Spalten 2 und 4 der Tabelle 7 werden zwei wichtige Punkte auffällig:

a) Alle Substanzen haben beim Wuchsstofftest erheblich höhere Aktivitäten (verglichen mit Ferrioxamin B) als beim Kreuztest.

b) Während der Kreuztest mehr oder weniger eine Spezifität für die Tri- und Dihydroxamsäuren zu erkennen gibt, sind im Wuchsstofftest alle untersuchten Verbindungen bis auf die erwähnten Fusarinin und Ferrichrom A wirksam.

Sollten der Antagonismus der Sideromycin-Wirkung und die Wachstumsförderung bei auxotrophen Stämmen auf dem gleichen Wirkmechanismus beruhen, so werden die in Punkt a und b genannten Unterschiede nur von unterschiedlichen Löslichkeiten und Diffusionsgeschwindigkeiten der getesteten Verbindungen hervorgerufen.

Aus diesem Grund wurde der Antagonismustest auch im flüssigen Medium durchgeführt, um die Frage der Löslichkeit und Diffusion in diesem Zusammenhang zu klären. Das Ergebnis ist aus der Tabelle 7, Spalte 3, zu ersehen.

Das zum vollständigen Antagonismus führende Konzentrationsverhältnis Antibiotikum / Antagonist bleibt für Sideramine ungefähr gleich und ist unabhängig davon, ob das Medium fest oder flüssig ist. Eine Steigerung der Aktivitäten, vor allem bei den hochmolekularen Sideraminen, wie es der Vergleich mit dem Wuchsstofftest erwarten ließ, wurde nicht beobachtet.

Im Gegensatz dazu konnten die synthetischen Chelatbildner ihre Aktivitäten im flüssigen Medium so entfalten, daß beispielsweise Fe-acethydroxamat gegen das Antibiotikum A22765 eine enthemmende Wirkung zeigte, die nicht viel geringer war als die des Coprogens.

Kurz zusammengefaßt lassen diese Beobachtungen den Schluß zu, daß die wachstumsfördernde Wirkung und der Sideromycin-Antagonismus auf zwei verschiedene Wirkmechanismen zurückzuführen sind, wie es von Nüesch und Knüsel 1965 vorgeschlagen wurde. Bei dem erstgenannten Mechanismus dienen die Sideramine und die Fe-Chelate als Eisen-Transport-Faktoren durch die Membran und/oder in der Zelle. Eine Möglichkeit zum Nachweis ihrer Wirkung wäre das Angebot von C- und Fe-markierten Verbindungen bei auxotrophen Stämmen, um dann die verschiedenen Zellfraktionen nach den gesuchten Faktoren zu prüfen.

Der zweite Mechanismus, Aufhebung der Sideromycin-Wirkung, ist ebensowenig geklärt. Als Wirkungsort, an dem die Substanzen mit dem Antibiotikum konkurrieren, werden vermutet:

Kohlenhydratabbau (Nüesch et al., 1967),

Einbau von Aminosäuren bei der Proteinsynthese (Knüsel et al., 1967 und 1969),

Permeation durch die Zellmembran (Zimmermann, 1970).

Geht es nur darum, Sideramine in Lösung nachzuweisen, erhebt sich nach den vorliegenden Untersuchungen die Frage, welche der drei Testmethoden geeigneter ist.

Die Sideramine sind bei allen Testmethoden hoch aktiv und leicht nachweisbar. Keiner der Chelatbildner kann sie in gleicher Konzentration (bezogen auf Eisengewicht) ersetzen. Sideramine des Ferrichromtyps, Coprogene, Fusigen und die Dihydroxamsäuren können in ihrer wachstumsfördernden Wirkung den Ferrioxaminen mehr oder weniger gleichgestellt werden; deren Aufhebungsvermögen beträgt jedoch nur 1/10 bis 1/100 desjenigen der Ferrioxamine. Bei dem Antagonismustest auf Agarplatten sind diese Gruppen durch ihren Aktivitätsgrad charakterisiert. Dagegen erscheinen die anderen Eisenchelate inaktiv. Aus diesem Grund ist der Kreuztest mit Sideromycinen als spezifische Nachweismethode für Sideramine zu bevorzugen.

Die Abhängigkeit der Sideraminwirkung von der Konzentration des Sideramins bildet eine charakteristische Kurve, aus der zu lesen ist, daß über eine bestimmte Grenze hinaus die Erhöhung der Konzentration keine entsprechende Steigerung der Wirkung zufolge hat. Die lineare Abhängigkeit ändert sich oberhalb einer bestimmten Konzentration, die für jede Verbindung spezifisch ist. Der Vergleich der Wirkung verschiedener Sideramine darf daher nur im linearen Bereich erfolgen. Diese Tatsache war sowohl bei den Antagonismusversuchen als auch beim Wuchsstofftest zu erkennen.

Ganz allgemein kann man beobachten, daß die Sideramine in Überdosis das Wachstum von Mikroorganismen nicht mehr fördern und sogar unterdrücken.

Zum Abschluß der Diskussion über diese vergleichenden Untersuchungen soll erwähnt werden, daß hier keine Benzoesäurederivate getestet wurden. Über die Funktion dieser relativ neuentdeckten Gruppe (erste zugehörige Verbindung Itosäure, Ito und Neilands, 1958) beim Eisenstoffwechsel der produzie-

renden Mikroorganismen liegen bereits mehrere Berichte vor (s. Einleitung; als Ergänzung: Peters und Warren, 1968, O'Brien et al., 1969, Ching-Chung-Wang und Newton, 1969b).

Bemerkenswert ist, daß das Molekül der Mycobactine eine Kombination der beiden chelatbildenden Strukturen, nämlich der Hydroxamatgruppe und Hydroxylgruppe des Phenolringes, darstellt (vgl. Ratledge, 1964). Aufgrund der ähnlichen Funktion und Bildungsbedingungen (Eisenmangel) sollten diese Verbindungen auf Antagonismus der Sideromycin-Wirkung und auf Wuchsstoffeigenschaften - neben den ähnlichen synthetischen Chelatbildnern wie Salicylaldehyd und 8-Hydroxychinolin - geprüft und mit Hydroxamsäuren verglichen werden.

Der Versuch zum Sideramin-Sideromycin-Antagonismus nach Voinkubation mit dem Antibiotikum wurde als Ergänzung zu den Untersuchungen von Zimmermann und Knüsel (1969) durchgeführt. Allerdings ist der Teststamm nicht Staph. aureus SG 511, sondern Staph. aureus 2070, Stamm der ETH, Zürich. Das Ergebnis entspricht jedoch nicht der Erwartung, wenn man annimmt, daß der Antagonismus nur auf Behinderung der Permeabilität des Antibiotikums beruht, wie es von den zwei genannten Autoren postuliert wurde.

Bei diesem Biophotometerversuch wird den Zellen nach 90 oder 120 Minuten Inkubation mit dem Antibiotikum A22765 Ferrioxamin B angeboten. Wie Zimmermann (1970) feststellte, sollte durch das aktive Transportsystem der Zellen soviel Antibiotikum intrazellulär angereichert sein, daß die Hemmwirkung ohne weiteres vollzogen wird. Wider Erwarten aber ruft die Sideramingabe nach einer kurzen Verzögerung relativ starkes Wachstum hervor. Die Stärke des Wachstums erreicht zwar nur 80 % derjenigen Kulturen, die Ferrioxamin B vor dem Antibiotikumszusatz erhielten; es darf aber nicht übersehen werden, daß bei keinem der Antagonismusversuchen (Agarplatten und Submerskulturen) das Wachstum vollständig wiederhergestellt wurde. Dieser Befund wird auch von Zähner et al. (1963) erwähnt. In der Kontroll-Kultur, die nur Antibiotikum enthielt (in glei-

cher Konzentration wie die Versuchskulturen) blieb das Wachstum bis zum Ende der Versuchszeit zurück. Damit ist auszuschließen, sideromycin-resistente Keime seien in den Versuchskulturen gewachsen und hätten den Antagonismus vorgetäuscht.

Offensichtlich ist das Sideramin fähig, auch nach dem Sideromycin in die Zelle einzudringen und zu dessen intrazellulärem Wirkungsort zu gelangen, um dort als Antimetabolit mit dem Antibiotikum zu konkurrieren.

Der einzige Fall, in dem Antagonismus bei einem definierten System untersucht worden ist, liegt in den Berichten von Knüsel et al. (1967 und 1969) vor. Sie konnten zeigen, daß das Antibiotikum A22765 in vivo den Einbau der markierten Aminosäure Leucin bei Staph. aureus und B. subtilis hemmt und daß Ferrioxamin B diese Wirkung zu antagonisieren vermag. Bei Wiederholung des Experiments im zellfreien System (1969) erzielte Ferrioxamin B keine Aufhebung der Wirkung mehr. Daraus ist zu entnehmen, daß der Antagonismus im ersten Versuch bei den Ganzzellen durch Behinderung der Permeabilität des Antibiotikums zustande kommt.

Der Zusammenhang zwischen Sideraminbedürfnis und Impfdichte bei Microbacterium lacticum weist offenbar daraufhin, daß der Stamm in der Lage ist - wie es schon bei zahlreichen Mikroorganismen nachgewiesen wurde -, bestimmte Verbindung zu synthetisieren, die mit Metall-Ionen Chelatkomplexe bilden kann und damit der Eisenversorgung der Organismen dient.

Die Ergebnisse dieses Versuchs stehen in guter Übereinstimmung mit denen von Byers et al. (1967) und Lankford et al. (1966) mit Bacillus megaterium.

Es ist bekannt, daß Bacillus-Arten unter Eisenmangel gewisse Verbindungen in die Kulturlösung ausscheiden (Garibaldi et al., 1956). Bei Bacillus megaterium konnte dieses Produkt Schizokinen isoliert und charakterisiert werden (s. Einleitung). Die Produktion ist der Konzentration der Eisen-Ionen

umgekehrt proportional. Bemerkenswert ist, daß der Stamm mit geringer Impfdichte unter diesen Bedingungen nicht wachstumsfähig ist. Mit größerem Inokulum jedoch kann das Wachstum ohne Zusatz von Eisen oder Sideraminen einsetzen. Auf gleiche Weise wäre die Unabhängigkeit der dicht beimpften Kulturen von Microbacterium lacticum zu erklären.

Es wäre aber auch möglich, daß die Organismen bei den dichtbeimpften Kulturen ihren Atmungsmechanismus umstellen und durch das Ausfallen des Cytochromsystems kein Sideraminbedürfnis mehr besteht.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, sollte bei sideraminauxotrophen Zellen, die mit geringer Sideraminversorgung gezüchtet wurden, die Katalaseaktivität rasch nach der Zugabe des Wuchsstoffes steigen. Erst nach dieser Phase sollte das Wachstum einsetzen.

Diese Hypothese wurde von den Ergebnissen aus dem Katalaseversuch - durchgeführt mit Microbacterium lacticum - nicht bestätigt. Die erhaltenen Werte, die jeweils im Vergleich mit einer sideraminfreien Kontrolle (s. Methode S. 23) gemessen wurden, zeigen keine Steigerung der Katalaseaktivität während der 90 Minuten Inkubationsdauer (die Zeit, in der die Zellen sich noch nicht zu teilen beginnen).

Das negative Ergebnis muß nicht bedeuten, daß Sideramine keinen Einfluß auf die Synthese von Enzymen des Cytochromsystems hätten. Im Hinblick auf die Ergebnisse aus dem Impfdichte-Versuch kann dieser Befund auf folgende Weise interpretiert werden:

Bei der Durchführung des Versuchs werden die Versuchskulturen - zwecks Gewinnung ausreichender Proteinmengen beim Zellaufschluss - mit möglichst großer Impfdichte eingesetzt. Wie aus dem später ausgeführten Versuch zum Zusammenhang zwischen Impfdichte und Sideramin-Empfindlichkeit (mit demselben Organismus) hervorgeht, ist Microbacterium lacticum

in hoher Impfdichte nicht mehr sideraminauxotroph, und infolgedessen kann auch kein Effekt von Sideramingabe auf die Bildung von Hämoproteinen erwartet werden.

5. Zusammenfassung

a) Es wurde geprüft, wieweit die üblichen biologischen Nachweismethoden Wuchsstofftest und Antagonismustest zur Identifizierung von Sideraminen und organischen Fe-Komplexen, die die Sideramine bei bestimmten Bedingungen in ihrer biologischen Funktion vertreten, beitragen können.

Die untersuchten Substanzen stammen aus Verbindungsklassen, die durch ihre Konstitution und zur Komplexbildung geeignete funktionelle Gruppen gekennzeichnet sind. Die Untersuchungen führten zu den folgenden Ergebnissen:

Beim Wuchsstofftest sind alle getesteten Verbindungen, nämlich Ferrioxamine, Sideramine des Ferrichromtyps, Fusigen, Coprogene, Dihydroxamsäuren und Monohydroxamsäuren, Eisencitrat, Eisen-EDTA, Hämin und Hämoproteine aktiv. Die vier zuerst genannten Gruppen sind besonders hoch- und mehr oder weniger gleich-wirksam.

Der Antagonismustest mit dem Antibiotikum A22765 und Staphylococcus aureus als Versuchsstamm wurde parallel auf Agarplatten und in Submerskulturen ausgeführt. Während auf den Agarplatten-Kreuztest-nur Ferrioxamine, Sideramine des Ferrichromtyps, Fusigen und Coprogene die antibiotische Wirkung aufheben, zeigen in Submerskulturen auch die Dihydroxamsäuren Mycobactin und Dimerumsäure neben den Verbindungen Eisen-acethydroxamat und Eisencitrat antagonistische Wirkung. Diese ist ungefähr von der gleichen Größenordnung wie die Wirkung von Fusigen und Coprogen. Das bedeutet, daß nur mit dem Kreuztest eine spezifische Funktion für die Sideramine zu erfassen ist. Der Test kann daher bevorzugt verwendet werden, wenn eine Substanz auf ihren Sideramincharakter geprüft werden soll.

Die Aktivitäten werden bei allen Testverfahren mit Ferrioxamin B in bezug auf das Verhältnis Eisengewicht / Molgewicht verglichen; es wurden stets relative Werte ermittelt.

Die beträchtlichen Unterschiede zwischen den Daten aus dem Wuchsstofftest und aus den beiden auf dem Antagonismus beruhenden Testmethoden deuten auf zwei verschiedene Mechanismen der Sideramin-Wirkung.

b) Bei Staphylococcus aureus konnte gezeigt werden, daß das Wachstum nach Vorinkubation mit Antibiotikum A22765 durch Zusatz von Ferrioxamin B wieder hergestellt wird. Dieses widerspricht der Hypothese von Zimmermann und Knüsel (1969), die den Antagonismus mit einer Konkurrenz von Sideramin und Sideromycin bei der Permeation der Zellwand erklären.

c) Die Sideramin-Auxotrophie ist bei Microbacterium lacticum von der Impfdichte abhängig. Dieses wurde experimentell bei Kulturen mit verschiedener Einsaat nachgewiesen. Bei einer hohen Impfdichte kann der Stamm in sideraminfreiem Medium ohne Wuchsstoffzusatz wachsen. Die Generationszeit ist bei den Kulturen mit hohen Einsaaten ohne Sideraminzusatz im Vergleich zu den Kulturen mit niedriger Einsaat, die Sideramin erhielten, stark verlängert.

d) Es wurde untersucht, ob bei Microbacterium lacticum - gezüchtet unter Sideramin-Mangel - nach Zugabe von Ferrioxamin B die Katalaseaktivität ansteigt, bevor das Wachstum beginnt. Das wäre zu erwarten, wenn Sideramine an der Synthese von Porphyrinenzymen beteiligt sind.

Das negative Ergebnis ist nach Punkt c) so zu verstehen, daß bei der hohen Zellzahl, die für die Versuchskulturen notwendig war, der Stamm nicht mehr sideramin-abhängig ist und daher die Sideramingabe keine maßgebende Wirkung auf die Synthese der Hämoproteine zur Folge haben kann.

6. Literaturverzeichnis

Anderson, T. J. and G. Ivanowics: Isolation and some characteristics of hämin dependent mutants of Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiol. 49, 31 - 40 (1967)

Arceneaux, J. L. and C. E. Lankford: A schizokinen (siderochrom) auxotroph of Bacillus megaterium, induced with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin. B. B. R. C. 24, Nr. 3, 370 - 375 (1966)

Antoine, D. A., N. E. Morrison and J. H. Hanks: Specifity of improved methods for mycobactin bioassay by Arthrobacter terregens. J. Bacteriol. 88, 1672 - 1677 (1964)

Atkin, C. L., J. B. Neilands and H. J. Phaff: Rhodotorulic acid from species of Leucosporidium, Rhodosporidium, Rhodotorula, Sporidiobolus and Sporobolomyces, and a new alanine-containing Ferrichrom from Cryptococcus melibiosum. J. Bacteriol. 103, 722 - 733 (1970)

Alexanian, S.: Untersuchungen über die Wirkung von Borrelidin auf die Biosynthese von Gramicidin S und die Wirkung von eisenorganischen Verbindungen auf das Wachstum von Microbacterium lacticum. Diplomarbeit, Tübingen, 1968

Bergmeyer, H. U.: Zur Messung der Katalaseaktivitäten. Biochem. Z. 327, 255 (1955)

Bickel, H., E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, V. Prelog, E. Vischer, A. Wettstein und H. Zähner: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 22. Über eisenhaltige Wachstumsfaktoren, die Sideramine und ihre Antagonisten, die eisenhaltige Antibiotika Sideromycine. Experientia 16, 129 - 133 (1960)

Brot, N., J. Goodwin and H. Fales: In vivo and vitro, formation of 2,3-dihydroxybenzoylserin by Escherichia coli K 12. B. B. R. C. 25, 454 - 461 (1966)

Burnham, F. B. and J. B. Neilands: Studies of the metabolic function of the ferrichrom componds. J. Biol. Chem. 236, 554 - 559 (1961)

Burnham, F. B.: Investigation of the iron-containing growth factors, sideramins and iron-containing antibiotics, sideromycins. J. Gen. Microbiol. 32, 117 - 121 (1963)

Burnham, F. B.: Bacteriol iron metabolism. Investigation on the mechanism of ferrichrom function. Arch. Biochem. Biophys. 97, 329 - 335 (1962)

Byers, B. R. and C. E. Lankford: Excretion of phenolic acids and a hydroxamic acid by Bacillus subtilis var. niger. Bacteriol. Proc. 1967, G 123

Byers, B. R., M. V. Powell and C. E. Lankford: Iron-chelating hydroxamic acid (Schizokinen) active in initiation of cell division in Bacillus megaterium. J. Bacteriol. 93, 286 - 294 (1967)

Ching-Chung-Wang and A. Newton: Iron transport in E. coli; Relationship between chromium sensitivity and high iron requirement in mutants of Escherichia coli. J. Bacteriol. 98, 1135 - 1141 (1969)

Ching-Chung-Wang and A. Newton: Iron transport in E. coli; Roles of energydependent uptake and 2,3-dihydroxybenzoylserin. J. Bacteriol. 98, 1142 - 1150 (1969)

Corbin, J. L. and W. A. Bulen: The isolation and identification of 2,3-dihydroxybenzoic acid and 2-N-6-N-di-(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-lysin, formed by iron-deficient Azotobacter vinelandii. Biochem. 8, 757 - 762 (1969)

Coultas, M. K. and D. J. Hutchison: Metabolism of resistant mutants of Streptococcus faecalis. IV. Use of biophotometer in growth-curve studies. J. Bacteriol. 84, 393 - 401 (1962)

Das, S. K. and G. C. Chatergee: Pyrithiamin adaptation of Staphylococcus aureus. 1. Adaptation and carbonhydrat utilisation. J. Bacteriol. 83, 1251 - 1259 (1962)

Demain, A. L. and D. Hendlin: "Iron Transport" componds as growth stimulator for Microbacterium sp. J. gen. Microbiol. 21, 72 - 79 (1959)

Diekmann, H. und H. Zähner: Konstitution von Fusigen und dessen Abbau zu Δ^2-Anhydromevalonsäurelacton. European J. Biochem. 3, 213 - 318 (1967)

Diekmann, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 56. Fusigen - ein neues Sideramin aus Pilzen. Arch. Mikrobiol. 58, 1 - 5 (1967)

Diekmann, H.: Stoffwechselprodukte aus Mikroorganismen, 81. Vorkommen und Struktur von Coprogen und Dimerumsäure. Arch. Mikrobiol. 73, 65 - 76 (1970)

Diekmann, H.: Untersuchungen zur Biosynthese von Sideraminen in Pilzen. Habilitationsschrift, Tübingen, 1969

Emery, T. and J. B. Neilands: The iron-binding centre of ferrichrome componds. Nature 184, 1632 - 1633 (1959)

Emery, T. and J. B. Neilands: Contribution to the structure of the ferrichrome compounds characterization of the acyl moieties of the hydroxamate function. J. Am. Chem. Soc. 82, 3658 - 3662 (1960)

Emery, T. and J. B. Neilands: Structure of the ferrichrome compounds. J. Amer. Chem. Soc. 83, 1626 (1961)

Emery, T.: Isolation, characterization and properities of Fusarinin, a Δ -hydroxamic acid derivat of Ornithin. Biochem. 4, 1410 - 1418 (1965)

Francis, J., H. M. Macturk, S. Madinaveitia and G. A. Snow: Mycobactin a growth factor for Mycobacterium johnei, I. Isolation from Mycobacterium phlei. Biochem. J. 55, 595 - 607 (1953)

Garibaldi, J. A. and J. B. Neilands: Isolation and porperties of ferrichrome. A. J. Amer. Chem. Soc. 77, 2429 - 2430 (1955)

Garibaldi, J. A. and J. B. Neilands: Formation of iron bindings componds by microorganisms. Nature 177, 526 - 527 (1956)

Gäumann, E., E. Vischer und H. Bickel: Verfahren zur Herstellung eines neuen Antibiotikums. Deutsche Auslageschrift (DAS) 1129, 259 (1961)

Gause, G. F.: Recent studies on Albomycin, a new antibiotic. Brit. Med. J. 1177 (1955)

Gause, G. F., und M. G. Brazhnikowa: Die Wirkung von Albomycin gegen Bakterien (russ.). Nov. Med. (Moskau) 23, 3 (1951)

Gibson, F. and D. I. Magrath: The isolation and characterisation of a hydroxamic acid AEROBACTIN formed by Aerobacter aerogenes 62 - 1. Biochem. et Biophys. Acta 192, 175 - 184 (1969)

Go, T. L.: Physiologische Untersuchungen an Brevibacterium flavum. Diplomarbeit, Tübingen, 1969

Haskell, Th. H., R. H. Bunge, J. C. French and Qu. R. Bartz: Succinomycin, a new iron-containing antibiotic. J.Antibiotics (Japan) Serie A, 16, 67 - 75 (1963)

Hendlin, D. and A. L. Demain: An absolute requirement for iron-transport factors by Microbacterium lacticum 8181. Nature 184, 1894 (1959)

Hesseltine, C. W., C. Pidacks, A. R. Witehill, N. Bohonos, B. L. Hutchings and J. H. Williams: Coprogen, a new growth factor for coprophilic fungi. J. Am. Chem. Soc. 74, 1362 - 1363 (1952)

Ito, T. and J. B. Neilands: Products of "low iron fermentation" with Bacillus subtilis; Isolation, characterisation and synthesis of 2,3-dihydroxybenzoylglycin. J. Am. Chem. Soc. 80, 4645 - 4647 (1958)

Keller-Schierlein, W.: Stoffwechselprodukte über Mikroorganismen, 45. Mitt. Über die Konstitution von Ferrirubin, Ferrirhodin und Ferrichrom A. Helv. Chem. Acta 46, 1920 - 1929 (1963)

Keller-Schierlein, W. und A. Deér: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 44. Mitt. Zur Konstitution von Ferrichrysin und Ferrichrocin. Helv. Chem. Acta 46, 1907 - 1920 (1963)

Keller-Schierlein, W., V. Prelog und H. Zähner: Siderochrome. (Natürliche Eisen(III)-trihydroxamat-Komplexe). Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 22, 279 - 322 (1964)

Keller-Schierlein, W. und H. Diekmann: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 85. Zur Konstitution des Coprogens. Helv. Chem. Acta 53, 2035 - 2044 (1970)

Knüsel, F., J. Nüesch, M. Scherer und B. Spiess: Der Einfluß von Siderochromen auf die Inkorporation niedermolekularer Substanzen in Ganzzellen von Bakterien. Path. Microbiol. 30, 900 - 908 (1967)

Knüsel, F., B. Spiess and W. Zimmermann: The influence exerted by sideromycin on poly-U-directed incorporation of phenylalanine in the S-30 fraction of Staphylococcus aureus. Arch. Mikrobiol. 68, 99 - 106 (1969)

Knüsel, F. and J. Nüesch: Mechanism of action of sideromycins. Nature 206, 674 - 676 (1965)

Knüsel, F. and J. Nüesch: Mechanism of action of siderochroms. IX Int. Congr. Microbiol., Abstr. of papers Moskow (1966)

Lankford, C. E., T. Y. Kustoff and T. P. Sergeant: Chelating agents in growth initiation of Bacillus globigii, J. Bacteriol. 74, 737 - 748 (1957)

Lankford, C. E., T. P. Sergeant, R. W. Traxler, T. Y. Kustoff, N. Nabbut and R. A. Finkelstein: Chemical factors in cultur media which influence bacterial growth initiation. U. S. A. F. School of Aviation Med., Rept. No. 58 - 86 (1958)

Lankford, C. E., J. R. Walker, J. B. Reeves, N. H. Nabbut, B. R. Byers and R. J. Jones: Inoculum-dependent division lag of Bacillus cultures and its relations to an endogenous factor (s) ("Schizokinen"). J. Bacteriol. 91, 1070 - 1079 (1966)

Lascelles, J.: An assay of iron protoporphyrin based on the reduction of nitrate by a variat strain of Staphylococcus aureus; synthesis of iron porphyrin by suspension of Rhodopseudomonas spheroides. J. Gen. Microbiol. 15, 404 - 416 (1956)

Lochhead, A. G., M. O. Burton and R. H. Thexton: A bacterial growth factor synthesized by a soil bacterium. Nature 170, 282 (1952)

Lochhead, A. G., S. Kramer and A. Goldberg: Quantitative measurement of the iron incorporating enzym in relation to marrow cells and liver tissue in the rabbit. Brit. J. Haematol. 9, 39 (1963)

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. H. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

Lück, H.: Katalase, in H. U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim, 885 - 897, 1962

Maurer, B., A. Müller, W. Keller-Schierlein und H. Zähner: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen 61. Ferribactin, ein Siderochrom aus Pseudomonas fluorescens Migula. Arch. Mikrobiol. 60, 326 - 339 (1968)

Morrison, N. E., A. D. Antoine and E. E. Dewbrey: Synthetic metalcelators which replace the natural growth-factor requirements of Arthrobacter terregens. J. Bacteriol. 89, 1630 (1965)

Müller, A.: Siderochrome aus Mikroorganismen. Dissertation, Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen, 1968

Müller, A. und H. Zähner: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 65. Mitt.: Ferrioxamine aus Eubacteriales. Arch. Mikrobiol. 62, 257 - 263 (1968)

Neilands, J. B.: A crystalline organo-iron pigment from the fungus Ustilago sphaerogena. J. Am. Chem. Soc. 74, 4846 - 4847 (1952)

Neilands, J. B.: Some aspects of microbial iron metabolism. Bacteriol. Rev. 21, 101 - 111 (1957)

Neilands, J. B.: Naturally occuring non-porphyrin iron compounds. Structure and Bonding, Vol. 1, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1966

Nüesch, J., F. Knüsel und M. Scherer: Der Einfluß von Siderochromen auf das Glutaminsäure bildende Bakterium Bevibacterium flavum ATCC 14067. Path. Microbiol. 30, 890 - 899 (1967)

Nüesch, J. and F. Knüsel: Sideromycins, in Gottlieb, D. and P. D. Shaw: Antibiotics I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 499 - 539 (1966)

O'Brien, I. G., G. B. Cox and F. Gibson: 2,3-dihydroxy-N-benzoylserin; chemical synthesis and comparison with natural product. Biochem. Biophys. Acta 177, 321 - 328 (1969)

O'Brien, I. G. and F. Gibson: The structure of ENTEROCHELIN and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserin conjugates from Escherichia coli. Biochem. Acta 215, 393 - 402 (1970)

Page, R. M.: The effect of nutrition on growth and sporulation of Pilobolus. Am.J. Bot. 39, 731 - 739 (1952)

Peters, W. J. and R. A. J. Warren: Itoic acid synthesis in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 95, 360 - 366 (1968)

Peters, W. J. and R. A. J. Warren: Phenolic acid and iron transport in Bacillus subtilis. Biochem. Biophys. Acta 165, 225 - 232 (1968)

Pollack, J. R. and J. B. Neilands: Enterobactin, an iron transport compounds from Salmonella typhimorium. B. B. R. C. 38, No. 5, 989 - 992 (1970)

Poralla, K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolid-Antibiotika. Dissertation, Tübingen, 1967

Porra, R. J. and O. T. G. Jones: Studies on ferrochelatase 1. Assay and properties of ferrochelatase from a pig-liver mitochondrial extract. Biochem. J. 87, 181 - 185 (1963a)

Porra, R. J. and O. T. G. Jones: Studies on ferrochelatase 2. An investigation of the role of ferrochelatase in the biosynthesis of various heam prostetic groups. Biochem. J. 87, 186 - 192 (1963b)

Ramsey, H. H. and C. E. Lankford: Stimulation of growth initiation by heat degradations products of glucose. J. Bacteriol. 72, 511 (1956)

Ratledge, C.: Relationship between the products of aromatic biosynthesis in Mycobacterium smegmatis and aerobacter aerogenes. Biochem. Biophys. Acta 141, 55 - 63 (1964)

Reynolds, D. M., A. Schatz and S. A. Waksman: Grisein,a new antibiotic produced by a strain of Streptomyces griseus. Proc. Soc. exp. Biol. 64, 50 (1947)

Reynolds, D. M. and S. A. Waksman: Grisein, an antibiotic produced by certain strains of Streptomyces griseus. J. Bact. 55, 739 - 752 (1948)

Rogers, S. J., R. A. J. Warren and J. B. Neilands: Amino-acid sequences within the ferrichrome cyclic hexapeptides. Nature 200, 167 (1963)

Salton, M. R. J. and J. H. Freer: Composition of the membranes isolated from several gram-positive bacteria. J. Biochem. Biophys. Acta 107, 531 - 538 (1965)

Sayer, J. M. and T. F. Emery: Structur of the naturally occuring hydroxamic acids, fusarinines A and B. Biochemistry 7, 184 - 190 (1968)

Sergeant, T. P., C. E. Lankford and R. W. Traxler: Initiation of growth of Bacillus species in a chemically defined medium. J. Bacteriol. 74, 739 - 748 (1957)

Snow, G. A.: Mycobactins: Iron-chelating growth factors from mycobacteria. Bacteriol. Rev. 34, 99 - 125 (1970)

Snow, G. A. and A. J. White: Chemical and biological properties of Mycobactins isolated from various Mycobacteria. Biochem. J. 115, 1031 - 1045 (1970)

Tsukiura, H., M. Okanishi, T. Ohmori, H. Koshiyama, T. Miyaki, H. Kitazima and H. Kawaguchi: Danomycin, a new antibiotic. J. Antibiotics (Japan) Ser. A 17, 39 - 47 (1964)

Weisel, P. and P. J. Allen: Abstr. Inst. Biol. Sci. Meeting Minneapolis, September 1951

Wolin, H. L. and H. B. Naylor: Basic nutritional requirements of Micrococcus lysodeicticus. Bacteriol. Proc., 55th General Meeting 47 (1955)

Zähner, H., H. E. Bachmann, R. Hütter und J. Nüesch: Sideramine, eisenhaltige Wachstumsfaktoren aus Mikroorganismen. Path. et Microbiol. (Basel) 25, 708 - 730 (1962)

Zähner, H., W. Keller-Schierlein, R. Hütter, K. Hess-Leisinger und A. Deer: Stoffwechselprodukte aus Mikroorganismen, 40. Sideramine aus Aspergillaceen. Arch. Mikrobiol. 45, 119 - 135 (1963)

Zähner, H.: Antibiotika in der Mikrobiologie. Naturwissenschaftliche Rundschau 17, 391 - 399 (1964)

Zähner, H., R. Hütter und E. Bachmann: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 23. Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. Arch. Mikrobiol. 36, 325 (1960)

Zimmermann, W. and F. Knüsel: Permeability of Staphylococcus aureus of the Sideromycin antibiotic A22765. Arch. Mikrobiol. 68, 107 - 112 (1969)

Zimmermann, W.: Sideramin-Resistenz und Sideromycin-Sideramin-Antagonismus bei Staphylococcus aureus. Dissertation, Universität Zürich, 1970

L e b e n s l a u f

Am 10.11.1939 wurde ich als Tochter des Maschineningenieurs Alexander Alexanian und seiner Ehefrau Ranusch in Teheran geboren.

Von 1946 bis 1953 besuchte ich die Volksschule und von 1953 bis 1959 das Gymnasium in Teheran, wo ich 1959 das Abitur ablegte.

Im Sommersemester 1963 begann ich an der Universität Würzburg das Studium der Biologie, Nach einem Semester wechselte ich an die Universität Tübingen über, wo ich im Frühjahr 1968 die Diplomprüfung in Biologie ablegte. Am Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie, begann ich 1968 mit der Durchführung der vorliegenden Dissertation.

Meine akademischen Lehrer waren

E. Bayer, E. Buddecke, E. Bünning,
W. Bues, A. Gierer, E. Kulzer, F. Lingens,
W. Löffler, H. Metzner, F. P. Möhres,
E. Müller, W. Rüdorff, F. Schneider,
G. Schramm, B. Schwemmle, J. Schwartz-
kopff, W. Schwartz, W. Seyffert, E. Stumpp,
G. Weitzel, H. G. Wittmann, H. Zähner.